

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年2月26日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/016789 A1(51) 国際特許分類: C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 14/47,
C07H 1/00, 3/00, C12N 5/10, C12Q 1/02, G01N 33/53(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル3階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/001718

(22) 国際出願日: 2003年2月18日 (18.02.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-238559 2002年8月19日 (19.08.2002) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友商事
株式会社 (SUMITOMO CORPORATION) [JP/JP]; 〒
104-8610 東京都中央区晴海一丁目8番11号 Tokyo
(JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI
特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 山本 一夫 (YAMAMOTO, Kazuo) [JP/JP]; 〒
112-0002 東京都文京区小石川 4-1 4-2 4-2 10
Tokyo (JP).

規則4.17に規定する申立て:

— すべての指定国のための不利にならない開示又は新
規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤 明
(SATO, Akira) [JP/JP]; 〒683-0835 鳥取県 米子
市灘町 3-9 6-1 Tottori (JP). 島内 淳子 (SHI-
MAUCHI, Junko) [JP/JP]; 〒202-0005 東京都 西東
京市 住吉町 2-4-2 2 Tokyo (JP). 松本 真理子
(MATSUMOTO, Mariko) [JP/JP]; 〒212-0054 神奈川
県 川崎市幸区小倉 1-1-E 2 1 6 Kanagawa (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する
申立て2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUGAR CHAIN LIBRARY CONSTRUCTED VIA CARGO RECEPTOR GENE MODIFICATION

(54) 発明の名称: カーゴレセプターの遺伝子改変による糖鎖ライブラリー

(57) Abstract: A method of modifying a sugar chain of a sugar chain-binding protein; a sugar chain-binding protein having a mod-
ified sugar chain; cells expressing a modified sugar chain-binding protein and a method of constructing the same; and a process for
producing a modified sugar chain-binding protein.(57) 要約: 本発明は、糖鎖結合タンパク質の糖鎖改変方法、及び糖鎖が改変された糖鎖結合タンパク質に関する。
また本発明は、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞及びその作製方法に関する。さらに本発明は、改変型糖
鎖結合タンパク質の製造方法に関する。

BEST AVAILABLE COPY



WO 2004/016789 A1

明 細 書

カーゴレセプターの遺伝子改変による糖鎖ライブラリー

5 技術分野

本発明は、糖鎖結合タンパク質の糖鎖改変方法、及び糖鎖が改変された糖鎖結合タンパク質に関する。また本発明は、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞及びその作製方法に関する。さらに本発明は、改変型糖鎖結合タンパク質の製造方法に関する。

10

背景技術

ヒトゲノムの全塩基配列が明らかになりつつある今日、これら膨大な情報をもとにテーラーメイド医療が始まろうとしている。タンパク質の発現をDNAチップを用いて網羅的に調べる診断法とそのデータに基づく薬物の処方、コンピューター上で行える時代となりつつある。また組換えタンパク質が容易に生成できるようになり、さまざまなサイトカインやホルモンを医薬品として用いることも益々加速されるものと思われる。

15

20

25

生体内ではさまざまな糖鎖を介した識別のメカニズムがあり、糖鎖は糖タンパク質の輸送や代謝に影響するため、これらタンパク質の生物活性を大きく左右する。また糖鎖の構造変化が癌細胞の異常増殖や転移に関与している可能性が示唆されている。従って、種々のタンパク質を薬剤として用いる場合、遺伝子工学的手法を利用して産生した組換えタンパク質の糖鎖構造を規定し、さまざまなグライコフォームを作り出す技術は、それらに新たな薬効を付与する技術となりうるものと考えられる。例えば、そのような技術を利用して、糖鎖構造を改変して糖タンパク質の細胞内における局在場所を調節・決定したり、糖タンパク質の代謝を調節することが可能となる。

しかしながら糖鎖の付加（グリコシル化）は、その情報が遺伝子に直接コードされていないことから、それを制御する技術はゲノムやプロテオーム研究によっては達成されない。

糖鎖構造を規定し制御する技術は確立されておらず、現在は各種の糖転移酵素をそれぞれ反応させて糖鎖が合成されている（例えば、特開平 1 1 - 4 2 0 9 6 号参照）。この場合、手作業では 2 ～ 3 ヶ月、合成装置を用いても数日を必要とする。また遺伝子工学を利用して糖鎖が付加されたタンパク質を発現させることも行われているが、一般的に用いられる大腸菌はタンパク質に糖鎖を付加することができず、また酵母はヒトとは異なる糖鎖が付加されるため、医薬として有用な糖タンパク質を得ることは困難である。

一方、医薬分野における糖鎖の要求も増大している。例えば、小児代謝性疾患である Congenital disorder of glycosylation type Ib などの疾患においては、欠損する糖鎖を投与することにより治療されている（Alper, J., Science, 291: 2339, 2001）。しかしながら上述したような背景から糖鎖合成は簡便ではなく、糖鎖医薬は高価となっている。

従って、種々の糖鎖を製造し、有用な性質を有する糖鎖が付加されたタンパク質を簡便かつ迅速に検索及び生成する手法が望まれている。

発明の開示

本発明は、簡便かつ迅速な糖鎖改変方法、及び得られる糖鎖結合タンパク質から糖鎖を製造する方法を提供することを目的とする。また本発明は、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法、及び糖鎖ライブラリーを提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を達成するため鋭意検討した結果、細胞内で糖タンパク質が生合成され選別される過程に糖鎖構造の識別が行われることに着目し、それにかかわるカーゴレセプターの糖鎖認識特異性を改変することにより、発現される糖タンパク質の糖鎖を改変かつ制御することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質の糖鎖を改変することを特徴とする、糖鎖結合タンパク質の糖鎖改変方法である。具体的には、該糖鎖改変方法は、以下のステップを含むものである：

(a) カーゴレセプター遺伝子の糖鎖認識部位をコードする塩基配列を改変するステップ；

(b) 上記カーゴレセプター遺伝子を細胞に導入するステップ；及び

(c) 上記細胞において糖鎖が改変された糖鎖結合タンパク質を発現させるステップ。

上記糖鎖改変方法において、カーゴレセプターは、VIP 36 及び／又は ERGIC-53 であることが好ましい。

また糖鎖結合タンパク質としては、例えば膜結合タンパク質及び分泌タンパク質が挙げられる。

10 本発明はまた、上記糖鎖改変方法により糖鎖が改変された糖鎖結合タンパク質である。

また本発明は、上記糖鎖結合タンパク質から糖鎖を切断することを特徴とする、改変された糖鎖の製造方法である。

さらに本発明は、上記製造方法により製造される改変された糖鎖である。

15

本発明はさらに、カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質の糖鎖を改変することを特徴とする、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法である。具体的には、該作製方法は、以下のステップを含むものである：

20 (a) カーゴレセプター遺伝子の糖鎖認識部位をコードする塩基配列を改変するステップ；

(b) 上記カーゴレセプター遺伝子を細胞に導入するステップ；

(c) 上記細胞において上記カーゴレセプター遺伝子を発現させるステップ；及び

25 (d) 糖鎖が改変された糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を選択するステップ。

また上記作製方法は、以下の (e) 及び (f) のステップを含むものであってよく、その場合、ステップの順序は特に限定されない：

(e) 細胞に所望のタンパク質の遺伝子を導入するステップ；及び

(f) 糖鎖が改変された所望の糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を得るステッ

プ。

上記作製方法において、カーゴレセプターは、VIP36及び／又はERGIC-53であることが好ましい。

また糖鎖結合タンパク質としては、例えば膜結合タンパク質及び分泌タンパク質が挙げられる。

本発明はまた、上記作製方法により作製される、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞である。

また本発明は、上記細胞を培養し、得られる培養物から改変型糖鎖結合タンパク質を採取することを特徴とする、改変型糖鎖結合タンパク質の製造方法である。

さらに本発明は、カーゴレセプターの糖鎖認識部位にランダム突然変異を導入し、改変された糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現させることを特徴とする改変型糖鎖ライブラリーの作製方法である。具体的には、該作製方法は、以下のステップを含むものである：

- (a) カーゴレセプター遺伝子の糖鎖認識部位をコードする塩基配列にランダム突然変異を導入するステップ；
- (b) 上記ランダム突然変異を有する各カーゴレセプター遺伝子を複数の細胞にそれぞれ導入するステップ；
- (c) 上記複数の細胞の各細胞において上記ランダム突然変異が導入されたカーゴレセプター遺伝子を発現させるステップ。

またさらに本発明は、上記改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を用いて、糖鎖結合タンパク質又は糖鎖結合タンパク質から切り出した糖鎖、あるいは特定の糖鎖と相互作用する被験物質をスクリーニングする方法である。具体的には、該スクリーニング方法は、以下のステップを含むものである：

- (a) 改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞と被験物質とを接触させるステップ；及び
- (b) 糖鎖結合タンパク質又は糖鎖と被験物質との相互作用を調べるステップ。

また上記スクリーニング方法は、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を

増殖させるステップをさらに含んでもよい。さらに上記スクリーニング方法は、所望の糖鎖結合タンパク質又は糖鎖を細胞表面に発現する細胞を選択するステップを含んでもよい。

- 5 以下、本発明を詳細に説明する。本願は、2002年8月19日に出願された日本国特許出願第2002-238559号の優先権を主張するものであり、上記特許出願の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

10 本発明は、種々の糖鎖を含む糖鎖ライブラリーを構築することを目的として完成されたものである。本発明者らは、真核細胞におけるタンパク質の分泌経路においてカーゴレセプターが糖タンパク質を認識し、その糖鎖修飾に関与していることに注目して研究を行った。それにより、カーゴレセプターの推定糖鎖認識決定部位を見出し、その部位を改変することによって、発現される糖タンパク質の糖鎖を改変することに成功した。

15

1. カーゴレセプター

カーゴレセプター (Cargo receptor) とは、糖タンパク質の品質制御と糖タンパク質のソーティングに重要な役割を果たす動物レクチンの総称である。現在カーゴレセプターとしては、小胞体 (ER) からゴルジ体への糖タンパク質の輸送
20 に関わる ERGIC-53 と、ゴルジ体における糖タンパク質の品質制御に関わる VIP36 が知られている (Hauri, H-P, et al., FEBS Letters 476 (2000) 32-37)。糖タンパク質は、図1に示すように、真核細胞内の小胞体 (ER) で糖鎖が付加された形態で合成された後、ゴルジ体において糖鎖のプロセッシングを受ける。この分泌経路と呼ばれる過程において、タンパク質は輸送小胞によって細胞内小器官を行き来する間に折りたたまれ、糖鎖が付加され、選別された後、機能すべき部位に向かうよう指定される。この輸送小胞に存在するカーゴレセプター
25 が糖タンパク質の糖鎖を認識し、細胞外に運搬されるタンパク質の選別を行っている。

初期のタンパク質は、まずERにおいて正確に折りたたまれ、オリゴマー化を

うける。この過程の間にタンパク質はそのA s n - X a a - S e r / T h r ペプチド配列（X a aはプロリン以外の任意のアミノ酸を表す）に糖鎖が付加される（Kornfeld R and Kornfelds, Ann Rev Biochem, 1985, 54:631-664）。この付加された糖鎖は脂質中間体から転移したオリゴ糖であり、マンノース、グルコース
5 及びN-アセチルグルコサミン（G l c N A c）からなる14個の糖単位を含むものである。細胞内の中心部では、糖タンパク質の糖部分（例えば最も外側にあるグルコース残基）がレクチンにより認識されて、正しく折りたたまれたタンパク質のみがそのグルコース残基を除去されてさらなる修飾のためにゴルジ体に運ばれる（Teasdale RD, and Jackson MR, Annu Rev Cell Dev Biol, 1996, 12:27-54）。

- 10 続いて、ERとゴルジ体の間の区画（ER-Glogi intermediate compartment : E R G I C）においては、カーゴレセプターの1つであるE R G I C - 5 3がERからE R G I Cへの糖タンパク質の輸送において機能する。またゴルジ体においては、種々の糖転移酵素とグリコシダーゼによって糖鎖の修飾がさらに行われ、これにより主にG l c N A c、ガラクトース、フコース、シアル酸などのより精巧なオリゴ糖が形成される。しかしながら、この修飾過程においては常に完全な糖鎖が形成されるわけではなく、生理的に機能しないと考えられる糖タンパク質
15 も生成される。V I P 3 6は、このような糖鎖修飾過程において形成される糖鎖の品質管理に機能を果たし、糖タンパク質のトランスゴルジ体からシスゴルジ体又はE R G I Cとの間の輸送において機能していると考えられている（Fullekrug J, J Cell Sci, 1999, 112 (Pt 17) : 2813-21)。V I P 3 6は、不完全な糖タンパク質をE R G I C又はシスゴルジ体における糖鎖修飾の初期段階に戻すことにより、不完全な糖タンパク質が分泌されないようにする。

- 上述したように、本発明において「カーゴレセプター」とは、糖鎖の修飾過程において糖タンパク質の糖鎖を認識し、生体内で必要とされる糖タンパク質の運搬に関与するものであれば特に限定されるものではなく、現在発見されているE
25 R G I C - 5 3及びV I P 3 6以外にも、今後発見されるであろう同様の機能を有するカーゴレセプターも本発明の範囲に包含される。

現在発見されている2種のカーゴレセプターは既に単離されており、E R G I C - 5 3については、ヒトE R G I C - 5 3がG e n B a n k アクセス番号

号 X 7 1 6 6 1 として登録されている。またこの塩基配列を配列番号 1 に、アミノ酸配列を配列番号 2 に示す。また V I P 3 6 に関しては、ヒト G P 3 6 b 糖タンパク質が G e n B a n k アクセス番号 U 1 0 3 6 2 として（塩基配列を配列番号 3 に、アミノ酸配列を配列番号 4 に示す）、イヌ（C. f a m i l i a r i s）V I P 3 6 が G e n B a n k アクセス番号 X 7 6 3 9 2 として登録されている。

カーゴレセプターは、その中央部分に糖鎖を認識して糖タンパク質と結合する「糖鎖認識部位」（C R D と呼ばれる）を有することが知られている（Hauri, H-P. et al., Jounal of Cell Science, 113:587-596, 2000）。本発明者は、カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することによって、細胞内においてカーゴレセプターにより認識される糖鎖が変更され、それにより糖鎖修飾過程が変化した結果、糖タンパク質として膜表面上に発現される又は細胞外に分泌されるタンパク質の糖鎖を改変できることを見出した。以下に、本発明に係る糖鎖改変方法と改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法について説明する。

2. カーゴレセプターの糖鎖認識部位の改変

（1）糖鎖認識部位

本発明者は、マメ科レクチンとの相同性比較を行うことにより、カーゴレセプターの糖鎖認識部位の中で、特に糖鎖に対する特異性を決定するために重要な推定糖鎖認識決定部位を特定した。推定糖鎖認識決定部位は、ヒト E R G I C - 5 3 の塩基配列（配列番号 1、翻訳開始の a t g の a を 1 とする）の 4 5 4 ~ 4 8 0 塩基、またアミノ酸配列（配列番号 2）の 1 5 2（A s p）~ 1 6 0（L y s）番目に相当する。ヒト V I P 3 6 の推定糖鎖認識決定部位は、塩基配列（配列番号 3）の 4 8 4 ~ 5 1 0 塩基、またアミノ酸配列（配列番号 4）の 1 6 2（A s p）~ 1 7 0（T h r）番目に相当する。ヒト以外のカーゴレセプターも、ヒトカーゴレセプターとの相同性から糖鎖認識決定部位を推定することが可能である。

本発明は、カーゴレセプターの糖鎖認識部位、特に糖鎖認識決定部位を改変することを特徴とする。本発明において「糖鎖認識部位の改変」とは、カーゴレセ

プターがタンパク質として発現された際に、その糖鎖認識部位又は糖鎖認識決定部位が改変前のものと比較して配列及び／又は構造が異なる、あるいは改変前の細胞において発現されるタンパク質の糖鎖と比較して異なる糖鎖が付加されることを意味する。従って、上述した特定の配列以外にも、改変前にタンパク質に付加される糖鎖と異なる糖鎖が付加されるようなカーゴレセプターの改変もまた本発明でいう「糖鎖認識部位の改変」に包含される。

糖鎖認識部位の改変は、任意の数の任意のアミノ酸を改変することができ、特に限定されるものではないが、糖鎖認識部位を変異導入により改変する場合、糖鎖認識部位を構成するアミノ酸において、アスパラギン酸（A s p）はC a及びM nに配位するアミノ酸として、アスパラギン（A s n）は側鎖が糖との協同的水素結合を形成し、C aに配位結合するアミノ酸として重要であり、カーゴレセプターの構造保持及び糖との結合親和性に大きく関与していると考えられるため、上記推定した9アミノ酸の糖鎖認識決定部位のうち、E R G I C-53ではアミノ酸152（A s p）と156（A s n）、V I P 36ではアミノ酸162（A s p）と166（A s n）を保存し、変異を導入しないことが好ましい。

（2）糖鎖認識部位へのランダム変異導入

本発明においては、カーゴレセプターの糖鎖認識部位（又は糖鎖認識決定部位）の改変をその遺伝子への変異導入により行うことが好ましい。遺伝子の一部の領域に変異を導入して遺伝子を改変する手法は当技術分野では周知である。導入される変異と改変される糖鎖との間の相関がわからない場合には、カーゴレセプターの糖鎖認識部位をランダムに変異させ、発現される糖タンパク質の糖鎖が改変されるかどうかを確認する。

遺伝子の一部の領域にランダムに突然変異を導入するには、当技術分野で公知のランダム突然変異誘発法を採用することができる。そのような手法としては、限定されるものではないが、縮重オリゴヌクレオチド法、リンカースキニング法、P C Rに基づく方法などが挙げられる。これらの手法に関しては、例えば「分子生物学実験プロトコール I」Ausubel, FM 著、西郷薫及び佐野弓子訳、1997年、丸善株式会社（特に第8章）、「新 遺伝子工学ハンドブック」改訂第3

版、村松正實及び山本雅編、1999年、株式会社羊土社（特に第216～226頁）などを参照されたい。本発明においては、可能な限り多くの種類のランダムなオリゴヌクレオチドを大量に調製するという目的を達成するために、縮重オリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR法）と組み合わせてランダムな変異を導入する手法が好ましい。縮重オリゴヌクレオチドを用いてPCR法によりカーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変する手法について以下に詳細に説明する。

（2－1）原理

- 10 縮重オリゴヌクレオチド法は、オリゴヌクレオチド合成時に正常塩基以外の塩基を混入することによりランダム変異が挿入された縮重オリゴヌクレオチドを合成することができるという事象に基づいている。この手法を利用することにより、カーゴレセプターの糖鎖認識部位に相当する領域について多様な変異が導入された縮重オリゴヌクレオチドを得ることができる。縮重オリゴヌクレオチド法は、
- 15 1塩基当たり10％突然変異率を得るために90％の正常塩基に各3.33％の他の3塩基を混入するなど、混入比率を増減させることにより突然変異率を制御できるという利点がある。

- 縮重オリゴヌクレオチドを作製するためのキットも多数市販されており、例えば、ExSite™PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）、
- 20 LA PCR™ in vitro Mutagenesis キット（Takara）などを用いることができる。このようなキットを利用した場合、プライマーの設計を変更することにより、点突然変異、数塩基の欠失・挿入など、多様な変異体を簡便に作製することが可能である。

25 （2－2）ランダムライブラリーの作製

最初に、多様な変異を有する糖鎖認識部位を含むカーゴレセプター遺伝子を得るために、上述した縮重オリゴヌクレオチドからなるランダムプライマーを用いて、ランダムに変異が導入された糖鎖認識部位を含むカーゴレセプター遺伝子のランダムライブラリーを作製する。

ランダムプライマーとしては、糖鎖認識部位の周辺の領域にハイブリダイズする縮重オリゴヌクレオチドを用いる。ランダムプライマーの設計方法は、当技術分野で公知であり、PCR反応条件などと共に当業者であれば容易に決定することができる。

- 5 以下のものに限定されるものではないが、本発明において利用可能なランダムプライマーを以下に示す：

・VIP36の糖鎖認識部位を含む3'末端側の後半断片を増幅するためのプライマー

10 VIPran3 : 5'-CGT GCT CTA GAC NNK NNK NNK AAT NNK NNK NNK GAG CGC GTG TTC CCG TA-3'、(配列番号7 : 配列中、NはA/T/G/C、KはG/Tを表す)

VIPran5 : 5'-ATC GTC TTA AGC ACT CAG TAG AAG CGC TTG-3' (配列番号8)

- 15 ・ERGIC-53の糖鎖認識部位を含む3'末端側の後半断片を増幅するためのプライマー (配列中、下線の部位は制限酵素部位を表す)

ERGIC-BF :

5'-CGTATCTAGATXXXXXXXXXXKAATXXXXXXXXXXKAATAATCCTGCTATAGTAATTAT-3' (配列番号14 : 配列中、KはG若しくはT、XはA、T、G、Cのいずれかを表す)

ERGIC-BR : 5'-CGTACTTAAGTGGTAGTCAAAAGAATTTTTTG-3' (配列番号15)

20

上述のように設計したプライマーの合成法は、当技術分野で周知である。例えば、ホスホアミダイト法などの一般的なオリゴヌクレオチド合成法を用いることができる。

- 25 続いて、上記設計したプライマーを用いて、カーゴレセプターcDNA又はcDNAライブラリー若しくはmRNAを鋳型として増幅反応を行う。増幅反応としては、限定するものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、LAMP法(Loop-mediated Isothermal Amplification)などが挙げられる。mRNAの抽出及びcDNAライブラリーの作製は常法に従って行うことができる。

このようにして得られたmRNAを鋳型として、ランダムプライマーと共に逆

転写酵素を用いて一本鎖DNAを合成した後、該一本鎖DNAから二本鎖DNAを合成する。PCR法の場合は二本鎖DNAが得られる。次に、得られた二本鎖DNAを適当なクローニングベクターに組み込んで組換えベクターを作製する。

5 5 そしてこの組換えベクターを用いて大腸菌等を形質転換し、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性等を指標として形質転換体を選択することにより、ランダムライブラリーを得ることができる。

次に、得られたクローンから目的のカーゴレセプター遺伝子を含む部分をクローニングする。DNAのクローニングには、例えばTAクローニング法が用いられる。TAクローニング法は、市販のキット、例えばInvitrogen社製のTAクローニングキットを用いて行うことができる。

10 上記スクリーニングにおいて得られたDNAの単離クローンについて、増幅産物をテンプレートにしてDNAの塩基配列を決定する。

塩基配列の決定はマキサムーギルバートの化学修飾法、又はM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定装置（例えばLI-COR社製DNA Sequencer LONG

20 上述した以外にも、カーゴレセプター遺伝子の塩基配列を基にして、当該塩基配列から1～数個の塩基の欠失、置換若しくは挿入を人為的に行う技術、例えば部位特異的突然変異誘発法により、カーゴレセプターとしての機能を維持させつつ糖鎖認識部位の配列の異なる変異体を作製することができる。例えば1～数個の塩基が置換されるような部位特異的突然変異誘発については、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 5662-5666 ; WO 85 / 00817 号公報 ; Nature 316 (1985) 601-605 ; Gene 34 (1985) 315-323 ; Nucleic Acids Res. 13 (1985) 4431-4442 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 6409-6413 ; Science 224 (1984) 1431-1433 等に記載の技術に従って変異体を取得し、これを利用することができる。また、市販のキット（Mutan-G、Mutan-K (Takara)）を用いてこれらの変異体を作製することができる。さらに、誤りを起こしやすいポリメラーゼ連鎖反応（error-prone PCR）もまた変異体作製方法として知られており、複製の厳

密度の低い条件を選択することによって1～数塩基の変異を導入することができる (Cadwell, R. C. and Joyce, G. F. PCR Methods and Applications 2 (1992) 28-33 ; Malboeuf, C. M. et al. Biotechniques 30 (2001) 1074-8 ; Moore, G. L. and Maranas C. D. J. Theor. Biol. 7; 205 (2000) 483-503) 。

- 5 ランダム突然変異は、例えばVIP36の糖鎖認識部位に相当する、14ヌクレオチドがA、T、G又はCのいずれかであり、7ヌクレオチドがG又はTのいずれかであるため、ランダムに変異導入された配列には、少なくとも $4^{14} \times 2^7$ (すなわち 3.4×10^{10}) の組合せが可能である。また例えばERGIC-53の糖鎖認識部位に相当する9アミノ酸のうち7アミノ酸に変異を導入することが可能であり、従って、14ヌクレオチドがA、T、G又はCのいずれかであり、7ヌクレオチドがG又はTのいずれかであるため、ランダムに変異導入された配列には、VIP36と同様に、少なくとも $4^{14} \times 2^7$ (すなわち 3.4×10^{10}) の組合せがある。さらに、欠失・挿入などの変異を導入することによって、ランダムライブラリーには多様な配列がより多く含まれることになる。

15

(2-3) ランダムベクター

上述のようにして得た多様な変異を有する糖鎖認識部位を含むカーゴレセプター遺伝子のランダムライブラリーを用いて、細胞をトランスフェクトするためのベクターを作製する。

- 20 細胞にトランスフェクトするためのランダムベクターは、上記ランダムライブラリーのDNAを適当なベクターに連結することにより得ることができ、トランスフェクト細胞は、上記ランダムベクターを、目的のカーゴレセプター遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。

- 25 ベクターとしては、トランスフェクション用のベクターとして当技術分野で公知のベクターが使用され、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルスベクター、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクター、細菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)などが挙げられる。

ベクターにランダムライブラリーのカーゴレセプター遺伝子を挿入するには、

まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

- カーゴレセプター遺伝子は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、組換えベクターには、プロモーター、カーゴレセプター遺伝子のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）などを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

DNA断片とベクター断片とを連結させるには、公知のDNAリガーゼを用いる。そして、DNA断片とベクター断片とをアニーリングさせた後に連結させ、ランダムベクターを作製する。

15 (2-4) 細胞へのトランスフェクション

トランスフェクションに使用する宿主としては、真核細胞であれば特に限定されるものではない。例えば、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞、MDCK細胞等）、昆虫細胞などが挙げられる。本発明をヒトなどの動物に由来するタンパク質の産生に適用する場合は、特に動物細胞を用いることが好ましい。

- 20 酵母を宿主細胞とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）などが用いられる。この場合、プロモーターは酵母中で発現できるものであれば特に限定されない。酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

25 動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞、Mardin Darbyイヌ腎細胞（MDCK細胞）等が用いられる。プロモーターとしてはSR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモ-

ター、CMVプロモーター等が用いられ、また、ヒトサイトメガロウイルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。動物細胞へのベクター導入方法は、市販のキット、
5 例えばE f f e c t e n e (登録商標)トランスフェクション試薬(Q I A G E N)、L i p o f e c t A M I N E 試薬 (I n v i t r o g e n) を製造業者のプロトコールに従って用いることにより簡便に行うことができる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、S f 9細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが挙げられる。
10

トランスフェクト細胞は、導入する遺伝子内に構成されるマーカー遺伝子の性質を利用して選択される。例えば、ネオマイシン耐性遺伝子を用いた場合には、G 4 1 8 薬剤に抵抗性を示す細胞を選択する。

目的のカーゴレセプター遺伝子が細胞に組み込まれたか否かの確認は、P C R
15 法、サザンハイブリダイゼーション法などにより行うことができる。例えば、トランスフェクト細胞からDNA又はmRNAを調製し、導入DNA特異的プライマーを設計してP C Rを行う。その後、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動などを行い、臭化エチジウム、S Y B R G r e e n 液などにより染色し、そして増幅産物を1本のバンドとして検出することにより、導入DNAを確認することができる。また、
20 予め蛍光色素などにより標識したプライマーを用いてP C Rを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレートなどの固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応などにより増幅産物を確認する方法も採用することができる。

(3) 分離

上述のとおりカーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変した後、特定の改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞は、その糖鎖に基づいて分離することができる。

特定の糖鎖に基づいてトランスフェクト細胞を分離する方法としては、当技術

分野で公知の糖鎖識別手法に基づくものであれば特に限定されるものではない。本発明においては、その簡便な点から、糖鎖結合特異性を有する複数種の植物レクチンを利用してトランスフェクト細胞の細胞表面上で発現されている糖鎖結合タンパク質の糖鎖を識別し、細胞を分離することが好ましい。

- 5 植物レクチンとしては、マッシュルーム（ABA）レクチン、タチナタマメ（ConA）レクチン、洋種チョウセンアサガオ（DSA）レクチン、レンズマメ（LCA）レクチン、ミヤコグサ（Lotus）レクチン、イヌエンジュマメ（MAM）レクチン、ホモ四量体E-サブユニットを持つインゲンマメレクチン（PHA-E₄）、ホモ四量体L-サブユニットを持つインゲンマメレクチン（PHA-L₄）、ヒママメ（RCA120）レクチン、及びコムギ胚芽（WGA）レクチンなどが挙げられる。

植物レクチンに関しては詳細な研究が行われており、例えば下記表1に示すように、その糖特異性が正確に解析されている。

15

表1

レクチン	糖特異性	糖鎖の種類
ABA	D-Gal	O-結合
ConA	α -D-Man, α -D-Glc	N-結合
DSA	β -D-GlcNAc, (β 1-4GlcNAc) _n	
LCA	α -D-Glc, α -D-Man	N-結合
Lotus	α -L-Fuc	
MAM	SA α 2-3Gal	N- 又は O-結合
PHA-E ₄	D-GalNAc	N-結合
PHA-L ₄	D-GalNAc	N-結合
RCA120	β -D-Gal	N- 又は O-結合
WGA	D-GlcNAc (bisecting)	N- 又は O-結合

植物レクチンは、例えばビオチン標識レクチンとして、Biotin-Lectin set I、II（ホーネンコーポレーション）が市販されている。

- 20 植物レクチンと糖鎖との研究に関しては、ホーネンコーポレーションのホームページにおいて、糖鎖分析プロトコール・レクチン関連情報として、表1に記載した以外の植物レクチン、それらの糖特異性、糖タンパク質精製手法などが掲載

されている (<http://www.honen.co.jp/finechem/>参照)。

上記植物レクチンの糖特異性を利用して、改変された糖鎖の種類を決定することができる。特定の植物レクチンと結合した糖鎖を有する細胞を検出する方法は、当技術分野で公知の手法であれば特に限定されず、例えば、標識した植物レクチン

5 ンを検出する手法などにより行うことができる。

好ましくは、標識した植物レクチンと結合した糖鎖を有する細胞を分離するために、磁気ビーズを用いて2次標識し、その磁性を利用して細胞を分離する手法 (Magnetic Cell Sorting; MACS法)、また標識の情報に基づいてフローサイトメトリーにより分取する手法 (Fluorescent Cell Sorting; FACS法) を採用

10 用することができる。フローサイトメトリーを利用した場合には、個々の細胞の標識を解析して細胞を分取することが可能であり、特定の糖鎖を有する細胞の1つ1つを正確に分離することができる。一方、MACSは、操作が簡便で短時間で行えることから細胞に対するダメージが少なく、また細菌の混入などの危険性が少ない。また、上記細胞を分離する手法は、1種類の手法を1回又は複数回行

15 ってもよいし、2種以上の手法を組み合わせそれぞれ1回又は複数回行ってもよい。

上述のようにして分離された細胞を継代培養することによって、特定の糖鎖を有する細胞を濃縮 (富化) することができる。

20 3. 改変部位と改変型糖鎖の確認

上述のようにして、カーゴレセプターの糖鎖認識部位にランダムに変異を導入し、得られた糖鎖結合タンパク質の糖鎖構造を調べることにより、改変部位と改変型糖鎖との相関関係を知ることができる。

従って、特定の改変型糖鎖を得るために特定の改変を行う場合には、カーゴレ

25 セプターの糖鎖認識部位に部位特異的に変異を導入する。そのような手法としては、Kunkel法、Gapped duplex法などの公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット (例えばMutan-K (TAKARA社製) やMuran-G (TAKARA社製)) などを用いて簡便に変異を導入することができる。

上述のようにカーゴレセプターの糖鎖認識部位に特定の変異を導入する、あるいはカーゴレセプターの糖鎖認識部位にランダムに変異を導入した後、所望の糖鎖を有するタンパク質を発現する細胞を選択することによって、所望の改変型糖鎖を有するタンパク質を細胞において発現させ、簡便に大量の改変型糖鎖を得る

5 ことが可能となる。

4. 改変型糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製

上述のように、変異部位と改変型糖鎖との相関が決定された場合には、特定の改変型糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を作製することができる。

10 あるいは、カーゴレセプターの糖鎖認識部位にランダムに変異を導入した細胞の中から特定の改変型糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を選択することにより得ることも可能である。本発明において「改変された糖鎖」又は「改変型糖鎖」とは、カーゴレセプターを改変する前の糖鎖と比較してその配列及び／又は構造が異なるものを指す。また本発明において「糖タンパク質」又は「糖鎖結合タンパク質」とは、糖とタンパク質から構成され、それらが共有結合して

15 いる物質を指す。

特定の改変型糖鎖を結合させようとするタンパク質は、慣例的な遺伝子工学的手法により、上記作製した細胞において発現させ、糖鎖を結合させることができる。そのようなタンパク質としては、以下に限定するものではないが、医薬品として使用するタンパク質、例えば、エリスロポエチン（EPO）、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、インターロイキン、抗体などが挙げられる。EPOは、糖鎖を改変することにより当該タンパク質の血中半減期が延長することが既に報告されている。また、抗体も糖鎖を改変することによって当該タンパク質の活性が増強することが報告されている。従って、糖鎖改変によって、タンパク質

20 が有する性質（効果）と同じ効果若しくはそれ以上の効果、又はその他の医薬上
25 有用な性質（効果）をタンパク質に付与することができる可能性がある。また特定の改変型糖鎖を結合させようとするタンパク質は医薬用タンパク質に限定されるものではなく、例えば生体内における糖鎖の影響を研究するための対象となるタンパク質、細胞間認識に関わるT細胞レセプター、NK細胞レセプター、ケモ

カインレセプター、MHCクラスI、II分子、接着分子であるNCAM（神経細胞接着分子）、カドヘリン、インテグリン、LFA-1（リンパ球機能関連抗原1）、ICAM-1（細胞間接着分子1）、GlyCAM-1、発生に関わるアクチビン、Notch、Delta、Serrate、細胞外マトリクスであるムチン、コラーゲンなども本発明に包含される。

上記作製した細胞において所望のタンパク質を発現させるには、例えば、「2. カーゴレセプターの糖鎖認識部位の改変」の項の（2-3）及び（2-4）に記載のように、当該タンパク質をコードする遺伝子を組換えベクターに挿入し、そのベクターを細胞に形質転換又はトランスフェクトする。その際、当該タンパク質を膜結合タンパク質として発現させようとする場合には、タンパク質をコードする遺伝子の他、細胞表層にタンパク質を輸送させる分泌シグナル配列及び細胞表層局在タンパク質の膜貫通ドメイン又はGPIアンカー結合配列などの配列を同一の遺伝子上にコードする融合遺伝子を構築し、その融合遺伝子を細胞において発現させる。また、当該タンパク質を分泌タンパク質として発現させようとする場合には、タンパク質をコードする遺伝子と分泌シグナル配列を同一の遺伝子上にコードする融合遺伝子を構築し、その融合遺伝子を細胞において発現させる。

分泌シグナル配列（分泌シグナル又は分泌シグナルペプチドともいう）は、一般に細胞外に分泌されるタンパク質のN末端に結合している。通常、細胞外に分泌されるタンパク質が細胞内から細胞膜を通過して細胞外へ分泌される際に除去される。本発明においては、所望のタンパク質を細胞外に移動及び発現させることができる分泌シグナル配列であれば、いずれのものも使用することができる。

細胞表層局在タンパク質は、宿主細胞の細胞表層に固定され、細胞表層に存在するタンパク質をいう。細胞表層とは、宿主細胞の最も外側の膜（例えば細胞壁、細胞膜など）の内部、細胞膜の最外層と外界との境界面、及び細胞の最外層からリンカー又はアンカーを介して突き出た領域のいずれをも意味する。細胞表層局在タンパク質としては、所望のタンパク質を細胞表層に固定化可能なものであれば特に限定されない。

本発明に係る改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を用いて所望のタンパ

ク質を発現させた場合には、当該タンパク質に改変型糖鎖が付加される。従って、本発明により、特定の糖鎖を所望のタンパク質に結合させることが可能である。

5. 改変型糖鎖結合タンパク質

- 5 本発明においては、上記「2. カーゴレセプターの糖鎖認識部位のランダム変異導入」又は「4. 改変型糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製」の項に記載のようにして作製された細胞を用いて、改変型糖鎖結合タンパク質を製造することが可能である。

- 10 本発明において、改変型糖鎖結合タンパク質は、上記作製した細胞を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養細胞又は細胞の破碎物のいずれをも意味するものである。トランスフェクトした細胞を培地に培養する方法は、宿主細胞の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

- 15 酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。ここで、培地に添加される炭素源、窒素源、無機物などについては当技術分野で公知である。

- 20 培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、約28～40℃で約18時間～10日間行う。培養期間中、pHは中性付近、例えばpH7.4に保持する。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

- 25 プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトシド（IPTG）等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドール酢酸（IAA）等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主細胞として得られたトランスフェクト細胞を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、DMEM培地、HAM F10培地などに5～20%ウシ胎児血清(FBS)を添加したもの、あるいは市販の種々の無血清培地などが用いられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃
5 で約18時間から10日間行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

培養後、目的の改変型糖鎖結合タンパク質は、通常のタンパク質精製手段等を用いて得ることができる。当該タンパク質が膜結合タンパク質である場合には細胞表面上に生産されるため、細胞を破碎・可溶化することによりタンパク質を抽出する。また当該タンパク質が分泌タンパク質である場合には、培養上清からタンパク質を採取する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、前記培養物中から目的のタンパク質を単離精製する
10 ことができる。

目的のタンパク質が得られたか否かは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等により確認することができる。

細胞を利用して改変型糖鎖結合タンパク質を製造する方法について詳述したが、
20 当業者には周知のように、無細胞系において糖鎖を改変し、改変型糖鎖結合タンパク質を製造することも可能である。無細胞系(例えば*in vitro*翻訳系)を利用してタンパク質を製造するためのキットが市販されており、このようなキットを利用することによって本発明を実施することができる。簡単に説明すると、例えばPromega社より販売されているTnT(登録商標) Coupled
25 Reticulocyte Lysate Systems(ウサギ網状赤血球)、TnT(登録商標) Coupled Wheat Germ Extract Systems(コムギ胚芽)などの*in vitro*転写／翻訳系を利用して、糖鎖認識部位を改変したカーゴレセプター及び所望のタンパク質を発現させることにより、その所望のタンパク質に改変型糖鎖が結合される。Promega社の*in vitro*翻訳系の詳細に関しては、Promega社のホームページ

ージ(http://www.promega.com/guides/ive_guide/default.htm)を参照されたい。

上述したように、本発明は特定の細胞系における改変型糖鎖結合タンパク質の製造に限定されるものではない。

5 6. 糖鎖の製造

上述のように改変型糖鎖結合タンパク質を得た後、当該タンパク質から糖鎖を切断することにより、改変された糖鎖を得ることができる。糖鎖の切断は、ヒドラジン分解法、酵素による分解など、当技術分野で公知の手法により行うことができる。ヒドラジン分解法については、ヒドラクラブヒドラジン分解試薬C（ホーネンコーポレーション）が市販されており、取扱説明書に従って糖鎖を切断することができる。また酵素による分解は、例えば、N-グリコペプチダーゼ、O-グリカナーゼを糖鎖結合タンパク質と反応させることにより、糖鎖を切断することができる。

本発明により、所望の糖鎖を簡便かつ大量に製造することができる。糖鎖は、生物及び化学分野を含む多くの分野で必要とされているが、その製造に時間的及び経済的にコストがかかっていた。本発明は、そのような糖鎖を必要とするあらゆる分野において非常に有用である。

7. 糖鎖ライブラリー

上記（2-2）で示したように、カーゴレセプターにランダムに変異を導入した配列を含むランダムライブラリーは、非常に大きなものである。従って、このカーゴレセプターのランダムライブラリーを用いて細胞をトランスフェクトすることにより、細胞表面上に改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞のライブラリーを作製することができる。また本ライブラリーは、本発明に従って作製された改変型糖鎖又は改変型糖鎖結合タンパク質から構成されるものであってもよい。

糖鎖の構造は生体内の機能に関与していると考えられるため、糖鎖を研究する上で本糖鎖ライブラリーは有用である。例えば、種々の糖鎖を含む糖鎖ライブラリーの中から重要な機能を有する糖鎖を検索することが可能となる。

本糖鎖ライブラリーから特定の構造又は機能を有する糖鎖を選択するには、例

例えば、植物レクチン、抗体、レセプターに対する結合性により選別する手法、 *in vivo*において、放射性標識した細胞を器官集積性（ターゲティング）について選別する手法などを用いることができる。

また本糖鎖ライブラリーは、多種多様な糖鎖結合タンパク質を発現する細胞又は糖鎖若しくは糖鎖結合タンパク質をチップ上に固定化して用いることも可能であり、そのようなチップは、特定の構造又は機能を有する糖鎖を網羅的に検出（スクリーニング）するために有用である。逆に、糖鎖ライブラリーの中からあらかじめ特定の糖鎖構造をもつ糖鎖又は糖鎖結合タンパク質若しくは細胞を選別し、それぞれ種々の蛍光ビーズ（Luminox社）又はチップ上に固定化して用いることも可能であり、そのような蛍光ビーズ又はチップは、特定の糖鎖構造を認識する物質（タンパク質等）又は細胞などの網羅的検出（スクリーニング）に有用である。本発明において「スクリーニング」とは、特定の糖鎖構造を持つ物質又は特定の糖鎖構造と特異的に相互作用する物質などの候補を選択する工程を意味し、糖鎖ライブラリー中の無数の糖鎖構造をふるい分けて候補物質を絞りこむこと、又は糖鎖ライブラリー中の特定の構造を持つ糖鎖結合タンパク質を発現する細胞と相互作用をする候補物質を絞り込むことを指す。具体的には、本発明のスクリーニング方法は、例えば以下のステップを含むものである：

- (a) 改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞又は改変型糖鎖若しくは改変型糖鎖結合タンパク質と被験物質とを接触させるステップ；及び
 - (b) 糖鎖結合タンパク質又は糖鎖と被験物質との相互作用を調べるステップ。
- ステップ(a)において、接触の方法は特に限定されるものではない。例えば、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞又は改変型糖鎖若しくは改変型糖鎖結合タンパク質と被験物質とを混合することにより、両者を接触させることができる。また、ステップ(b)において、相互作用を調べる方法も特に限定されるものではなく、当業者に公知の種々の方法を利用して相互作用を調べることができる。

また上記スクリーニング方法は、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞を増殖させるステップ、及び／又は所望の糖鎖結合タンパク質又は糖鎖を細胞表面に発現する細胞を選択するステップを含んでいてもよい。例えば、糖鎖ライブラ

リーに含まれる改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞は、通常の細胞増殖法に従って増殖させることにより、改変型糖鎖の量を増やすことも可能である。また、本発明においては、細胞上に糖鎖結合型タンパク質が発現されることから、フローサイトメトリーなどの手法を利用して、特定の糖鎖を研究することも可能である。

特定の糖鎖を認識するタンパク質は、ウイルスや細菌などの感染を含む種々の疾患に関わっている例も多く、そのようなタンパク質をスクリーニングして見出すことが望まれる。また、特定の糖鎖をもつウイルスや細菌上の特定の糖鎖が細胞と結合することにより感染が成立したり、特定の糖鎖が抗体または細胞と接触することにより抗体又は細胞の機能を調節することも知られており、その調節機構を調べることも望まれている。従って、本発明に従って特定の糖鎖を認識するタンパク質又は特定の糖鎖の生体内調節機構を見出すことによって、疾患の薬剤や診断糖の標的分子が明確となり、副作用のない薬剤を効率的に設計したり、疾患のより高度な診断が可能となることが期待される。

図面の簡単な説明

図1は、糖タンパク質の糖鎖修飾と糖の品質管理に関与するカーゴレセプター(ERGIC-53及びVIP36)と、分泌経路の概要を示す図である。

図2は、VIP36ライブラリー構築の概要を示す図である。

図3は、VIP36へのランダム突然変異導入結果を示す図である。Aに変異VIP36の推定糖鎖認識決定部位の塩基配列を、Bにそのアミノ酸配列を示す。

図4は、MDCK細胞における改変VIP36の過剰発現を示す写真である。

図5は、レクチン陽性(赤)及び陰性(黒)MDCK細胞に対する植物レクチンの結合を示す図である。上段が非トランスフェクト細胞、中段が変異VIP36トランスフェクト細胞、下段が非トランスフェクト対照MDCK細胞を示す。

図6は、レクチン陽性(赤)及び陰性(黒)MDCK細胞に対するPHA-E₄及びWGAの結合を示す図である。最上段が野生型細胞、上から2段目が変異VIP36トランスフェクト細胞の1回目の分離後、下から2段目が変異VIP36トランスフェクト細胞の2回目の分離後、最下段が変異VIP36トランス

フェクト細胞の3回目の分離後の結果を示す。

図7は、レクチン結合にトリプシン処理が及ぼす影響を示す図である。PBS-E D T A処理を赤、トリプシン-E D T A処理を青で示す。

図8は、E R G I C-53の糖鎖認識決定部位にランダムな改変を導入するためのランダムプライマーの設計を示す概要図である。

図9Aは、1次抗体として抗FLAG抗体を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG₁-F I T Cを用いてサンプルを作製し、蛍光顕微鏡で観察した写真を示す図である。ネガティブコントロールとして、野生型MDCK細胞を観察した。

図9Bは、1次抗体として抗FLAG抗体を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG₁-F I T Cを用いてサンプルを作製し、蛍光顕微鏡で観察した写真を示す図である。ポジティブコントロールとして、V I P 3 6-FLAG clone 8 (恒常的な発現が確認されているクローン)を観察した。

図9Cは、1次抗体として抗FLAG抗体を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG₁-F I T Cを用いてサンプルを作製し、蛍光顕微鏡で観察した写真を示す図である。MDCK細胞にE R G I Cランダムライブラリーをトランスフェクトし、1.5mg/mlのG418で10日間選択を行った後の細胞の観察を行った。

図10は、MACSによる選別後の細胞を1次抗体に各種ビオチン標識レクチン、2次抗体にF I T C標識ストレプトアビジンを用いて解析したヒストグラムを示す図である。黒線はコントロールのMDCK細胞、赤線はMACS後の(-)画分、緑線は(+)画分を示す。

図11は、PNAレクチンを用いたMACSにより分画したMDCK細胞をFACSにて解析したヒストグラムを示す図である。PNA(-)、PNA(+)、PNA2(+)のPNAに対する結合強度を比較した。

図12は、PNA(-)、PNA(+)、PNA2(+)について、5種類のビオチン標識レクチンを1次抗体、ストレプトアビジンアルカリホスファターゼを2次抗体として用いてウエスタンブロッティングを行った結果を示す写真である。

図13は、対照、PNA(-)、PNA(+)、及びPNA2(+)について、

MAM又はPNAを1次抗体、ストレプトアビジンFITCを2次抗体として用いてFACSを行い、各細胞画分の糖結合特異性を解析した結果を示す図である。

図14は、フローサイトメトリー又は磁気細胞分離法(MACS)を利用して、標識したレクチンを用いて特定の糖鎖を有する細胞を分離する手法の概要を示す図である。

図15は、フローサイトメトリー(FACS)を利用して、PNAレクチンと特異的に結合する糖鎖を有する細胞を分離し、濃縮する過程における、PNAレクチンに標識された蛍光の強度を示す図である。

図16は、クローン12及び対照CHO細胞における改変VIP36とPNAレクチンに認識される糖鎖の発現を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものでない。

〔実施例1〕VIP36ランダムライブラリーの作製

(1) プラスミドpRc/CMV2-flag-VIPh-AflII

本実施例においては、図2に示すようにVIP36の糖鎖認識決定部位をコードしているcDNA部分にランダム突然変異を導入するため、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行って増幅されるcDNA断片(VIPtと呼ぶ。全長1407ヌクレオチドのうち481から1071までのヌクレオチド)にランダムに突然変異が導入された糖鎖認識決定部位が含まれるように、糖鎖認識決定部位をコードしているcDNAと重複するランダム化オリゴヌクレオチドとして、下記のプライマーを設計した。

VIP36ランダムライブラリーを構築するために下記の4つのプライマーを用いた(図2A)。すなわち、VIPran1: 5'-GCA TGT CGA CAT AAC TGA CGG CAA CAG TG-3' (配列番号5: ヌクレオチドの5'末端に制限酵素認識決定部位HincII: GTC GACを含む)、VIPran2: 5'-GAG CTC TAG AAA GAT GGC TAA GCC GTG GAA-3' (配列番号6: 5'末端にXbaI部位: TCT AGAを持つ)、VIPran3: 5'-CGT GCT CTA GAC NNK NNK NNK AAT NNK NNK NNK NNK GAG CGC GTG

TTC CCG TA-3'、(配列番号7:配列中、NはA/T/G/Cの、KはG/Tの混合物であり、5'末端にXbaI部位を持つ)、及びVIPran5:5'-ATC GTC TTA AGC ACT CAG TAG AAG CGC TTG-3'(配列番号8:5'末端にBfrI部位:CTT AAGを持つ)。

- 5 VIPran1及びVIPran2プライマーはVIP36遺伝子の5'末端側半分(VIPh断片、全長1407のうち133-480ヌクレオチド)を構築するためのPCRに用いた。最初に、プライマーを10 μ lのVIPran1 (2 μ g/ μ l)、10 μ lのVIPran2 (2 μ g/ μ l)、2 μ lの10 \times Kination buffer A (New England Biolab)、1.5 μ lの10mM ATP、6 μ lの水、1.5 μ lのT4キナーゼの混合物中で、リン酸化した。溶液は37 $^{\circ}$ Cで2時間保温した。PCRは、1.5 μ lの各リン酸化プライマー、5 μ lの10 \times KOD plus buffer (TOYOBO)、2 μ lのMgSO₄ (TOYOBO)、2 μ lの2mM dNTP混合物、2 μ lのpBluescript-VIP36 (鋳型として、10ng/ μ l)、3.5 μ lの水、及び1 μ lのKOD plus (TOYOBO) からなる反応溶液で行った。PCRプログラムはPCR express (Hybaid) 又はGeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) のいずれかで
10 行い、94 $^{\circ}$ C 2分間で開始、次いで94 $^{\circ}$ C 20秒、52 $^{\circ}$ C 30秒、68 $^{\circ}$ C 1分間を30サイクル行い、その後68 $^{\circ}$ Cで5分間ホールドとした。
- 20 増幅されたVIPh断片を1%アガロースゲル電気泳動によって回収し、次いでゲル抽出(QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen)を行い、TEバッファー中に保存した(図2B)。SmaI消化に次いでアルカリホスファターゼ処理を行った後、VIPh断片をpBluescript (pBluescript SK(+)) (Stratagene))と15 $^{\circ}$ Cで
25 一晩ライゲーションした。このように調製された混合物を、ヒートショック法によってCaCl₂処理した大腸菌JM109株に形質転換し、色で選抜するために50 μ lの5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β ガラクトシド(X-gal)と4 μ lのイソプロピル-1-チオ- β ガラクトシド(IPTG)とともにLB-Ampプレート上で一晩培養した。白色のコロニーを選抜し、100

$\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン存在下でのLB培地 (LB-Amp培地) 中で一晚培養した。Plasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて、一晚培養した培地からプラスミドDNAを抽出し、TEバッファー中に保存した。その後、PBS-VIPhベクターを、VIPh断片を含むpBluescriptのHincII及びNotIで消化して得た。消化したVIPh断片 (それぞれの末端がHincII及びNotIで切断され3'末端にいくつかのpBluescriptヌクレオチドを持つVIPh') を、QIAquick Gel Extraction Kitを用いて抽出し、TEバッファー中に保存した。VIPh'断片を、HpaI及びNotI (HpaI部位及びNotI部位はそれぞれflagタグ付きpRc/CMV2に存在する) で消化されたpRc/CMV2-flagと15℃で一晩ライゲーションした。pRc/CMV2-flag (5641bp) は、flag配列 5'-GAC TAC AAA GAC GAT GAC GAC AAG-3' (配列番号9) がpRc/CMV2のHincII (5641bpのうち1981塩基対) 及びHpaI制限酵素認識部位の間に挿入された改変pRc/CMV2 (カタログ番号V750-20, Invitrogen) である。ライゲーションされた混合物を大腸菌に形質転換し、37℃で一晩LB-Amp寒天プレート上で培養した。4つのコロニーを選抜し、それぞれ37℃で一晩LB-Amp培地中で培養した。その後、Plasmid Mini Kitを用いて回収したpRc/CMV2-flag-VIPhを配列決定した。

pRc/CMV2-flag-VIPhの配列決定は、0.75 μl のpRc/CMV2F (フォーワードダイプライマー)、0.75 μl のpRc/CMV2R (リバースダイプライマー) 及び0.5 μl の25mM dNTP、1 μl のThermosequencase™ (usb)、1 μl のThermosequencase™反応バッファー (usb)、1.5 μl のpRc/CMV2-flag-VIPh及び1.5 μl の水を含む、全8.5 μl の溶液によるダイデオキシ法を適用した。その後、16 μl の混合物をそれぞれ4つの0.2mlチューブに加え、それぞれ同量 (16 μl) のddATP、ddTTP、ddGDP、及びddCTPを加えた。PCRは混合液を用いて、標準的な方法によって、最初に95℃5分間、次いで94℃30秒、50℃30秒、70℃50秒を30サ

イクル行い、最後に70℃にて50秒間とした。

VIPtランダム断片を挿入するために、AflIIIリンカーを構築した。AflIII制限酵素認識部位（AflIIIリンカー）を持つオリゴDNA断片をプラスミドベクターに導入した場合には、VIPh及びVIPt断片を順番に挿入

5 することが可能となる。リンカーの2つの相補的なオリゴヌクレオチド配列は、5'-CTA GAA GTC CTT AAG AGT CGG GCC-3'（配列番号10：AflIIIリンカー1）及び5'-CGA CTC TTA AGG ACT T-3'（配列番号11：AflIIIリンカー2）とした。AflIIIリンカーには、5'及び3'末端のそれぞれに、XbaI及びApaI（GGGCCC）部位に適した粘着末端が形成された。

- 10 最初に、20μlのAflIIIリンカー1、20μlのAflIIIリンカー2及び0.5μlの1M Tris/HCl pH7.5の混合物を100℃で煮沸し、その後、互いにアニーリングするよう、その温度が室温に達するまで冷却した。次に、pRc/CMV2-flag-VIPhベクターを適切な酵素によってXbaI及びApaI制限酵素認識部位で消化し、その後、1%アガロースゲル電気泳動によってベクターを回収し、次いでQIAquickゲル抽出を行っ
- 15 た。その後、リンカーとpRc/CMV2-flag-VIPh（VIPhの3'末端のXbaI部位、及びpRc/CMV2のApaI部位で消化した）を以下のような組成でライゲーションした。すなわち、3μlの32nM pRc/CMV2-flag-VIPh、3μlの約172μM AflIIIリンカー、6μl
- 20 のTakara ligation kitのSolution I（Takara）であった。ライゲーション混合物を15℃で6時間又は一晩保温した。

- その後、ライゲーション混合物を大腸菌細胞（JM109）に形質転換した。具体的には、4μlの反応混合物を50μlのCaCl₂処理した大腸菌に加え、事前に15mlチューブ中で冷却した。それを30分間氷上に置き、次いで42℃
- 25 で1分間、振とうせずに保温した。直ちに氷上で2分間冷却した。形質転換した細胞を37℃で1時間SOC培地（10mlの2Mグルコースを添加したSOB培地：500ml当たり、バクトトリプトン10g、バクト酵母抽出物2.5g、NaCl 0.29g、KCl 0.09g、1M MgCl₂+1M MgSO₄の混合物10mlを含む）で培養した後、細胞をLB-Ampプレートに塗布し、

コロニーを成長させるために37℃で一晩培養した。

4つのコロニーを選抜してLB-Amp培地で一晩培養し、次いでプラスミド抽出を行った。これらの4つのコロニーのうち、少なくとも1つのコロニーについて、AflIIによる消化とそれに次ぐ電気泳動によって、プラスミドを包含
5 することを確認した(図2C)。プラスミド(pRc/CMV2-flag-VIPh-AflII)を配列決定し、100μlのTEバッファー(350ng/μl)中に保存した。

(2) VIPtのpRc/CMV2-flag-VIPh-AflIIへの挿入

10 VIPran3及びVIPran5プライマーはVIP36遺伝子の3'末端側半分(VIPt断片、全長1407のうち481-1071ヌクレオチド、突然変異導入)を構築するためのPCRに用いた(図2A)。VIPt断片は、ランダムに変異したヌクレオチドを含むようにするため、PCRを行うために比較的厳密でない校正活性を持つKOD dash DNAポリメラーゼ(TOYOBO
15 O)を選択した。ランダムライブラリー構築のため大量で広い多様性を持つ変異VIPt断片が得られるよう、反応条件を最適化するために様々なPCR条件を試した。その結果、ランダム化プライマー(VIPran3プライマー)の最適濃度は30pmol/μlと決定した。これに対し、VIPran5プライマーは、10pmol/μlと決定した。特に、25mM MgSO₄を含むPCRを
20 選択した。

KOD plus(TOYOBO)DNAポリメラーゼをもまたPCR増幅のために使用し、最適化のための実験を行った。

VIPt断片(図2B)をAflII(断片の3'末端)及びXbaI(5'末端)で消化した。小さい消化断片を除去するため電気泳動し、その後VIPt断片を、pRc/CMV2-VIPh-AflIIのVIPhの3'末端のXbaI部位及びAflIIリンカーのAflII部位が消化されたpRc/CMV2-flag-VIPh-AflIIにライゲーションした(図2D)。ライゲーション溶液を15℃で一晩保温した。制限酵素認識部位AflIIは2つの理由から制限酵素BfrIによって消化されることが重要であった。第一の理由は、
25

それがA f l I I 酵素と同じ配列を認識すること、第二の理由は、A f l I I 酵素によって消化された部位は低いライゲーション反応効率を生じることが製造メーカーによって報告されており、それはライブラリーの構築にとって重大であったからである。

- 5 大腸菌 J M 1 0 9 への形質転換は、上述と同様に標準的な手法により行った。
ElectroMaxTM D H 5 α -ETM細胞 (Gibco BRL, Life Technologies : カタログ
番号 1 1 3 1 9 - 0 1 9) を用いたエレクトロポレーションも行った。エレクト
ロポレーションを行う前に、ライゲーション溶液を精製し、標準的な方法でエタ
ノール沈殿によって濃縮した。また、1 5 m l 試験管で 1 m l の S O C 培地を 3
10 7℃で前もって保温し、キュベットを氷上で冷却し、別の新しい 1 5 m l 中 1 μ
l の p R c / C M V 2 - f l a g - V I P h - V I P t DNA を氷上で冷却し
た。2 0 μ l の D H 5 α -ETM細胞を p R c / C M V 2 - f l a g - V I P h -
V I P t DNA を含む上記の試験管に添加した。2 回穏やかにピペットで懸濁し
た後、プラスミド-大腸菌混合物を先に冷却しておいたキュベットに移した。そ
15 の後、Electro Cell Manipulator (登録商標) 600 (B T X) によって 2 . 4 5 k
V 及び 1 2 9 Ω の条件下でエレクトロポレーションを行った。上記の条件は、い
くつかの電圧条件の簡単な試験の後に選択された。1 . 5、2 . 0 及び 2 . 4 5
k V の電圧を試験した。直ちに (1 分以内に)、1 m l の予め保温した S O C 培
地を添加し、穏やかに混合した。溶液を新しい 1 5 m l 試験管に移し、3 7℃で
20 1 時間培養した。その後、1 時間培養した溶液各 1 0 0 μ l を L B - A m p 寒天
プレートに塗布した。プレートを 3 7℃で一晩培養した。形成されるコロニー数
が 1×10^6 に達するまでエレクトロポレーションを繰り返した。いくつかのコ
ロニーを配列決定のために選抜し、p R c / C M V 2 - f l a g - V I P h - V
I P t のランダムな突然変異が導入されたかどうかを確認した (図 3)。塩化カ
25 ルシウム法とエレクトロポレーションの両方によって形質転換された、ベクター
への挿入断片の数は、X b a I 及び B f r I による制限消化によって決定した。

(3) V I P 3 6 ランダムライブラリーの回収

まず最初に、5 0 m l の L B - A m p 培地をコロニーを培養している L B - A

mp寒天プレートに加えた。コンラージ棒（TGK）を用いてコロニーを添加した培地と穏やかに混合することによって、コロニーを寒天から物理的に分離した。その後、懸濁液を新しい50mlチューブに移した。懸濁液はその後、細胞増殖のため更に培地を与えるために、LB-Amp培地で50mlにそろえた。培地中の懸濁液は37℃で一晩培養した。培養の間は空調に注意した。一晩培養した大腸菌懸濁液500μlを保存用として回収し、-80℃で17%グリセロール中に保存した。上記の方法を各々の寒天プレートについて行った。懸濁液からプラスミドを抽出するために、10枚の異なる寒天プレート由来の懸濁液を一緒に適切な量混合した。各プレートから混合する懸濁液の量は、各プレートのコロニー数の比率によって決定した。これは特定の突然変異を持つVIP36 DNAが他のものより優勢になることを避けるためである。混合物からQIAGEN Plasmid Midi Kitによってプラスミドを回収し、100μlのバッファ中で保存した。その後、プラスミド（ランダム化されたVIPtの糖鎖認識部位を有すると推定されるpRc/CMV2-flag-VIPh-VIPtの混合物）を32本の15mlチューブにプールし、以後の実験に使用した。

プラスミドに導入されたインサートを調べるために、数個のコロニーを拾い上げ、大腸菌細胞から抽出されたプラスミドをXbaI及びBfrIで消化した。培養された総コロニー数の少ないプレート（通常40～200コロニー）では、調べた12のうち10コロニー（83%）が目的のプラスミドを含んだのに対して、総コロニー数の多いプレート（1000～6000コロニー）では、6のうち4コロニー（67%）が目的のプラスミドを持っていた。従って、概算されたライブラリーのサイズは、 8×10^5 、又は 6×10^5 であった。ランダムに突然変異させた糖鎖認識部位をコードする遺伝子は、配列解析によって確認した（図3）。

〔実施例2〕細胞へのトランスフェクション

(1) EffecteneTMによる安定なトランスフェクション

実施例1において構築されたVIP36ライブラリーは、32本の15mlチューブに保存されているため、まず、32本の個別のプールに別々に保存されて

いるライブラリー溶液の一部を混合することによって、TEバッファー117、
4 μ l 中にプラスミドを調製した。混合する溶液の割合は、各ライブラリープ
ールに含まれる個々のクローンの規模に従って決定した。この計算は、ランダム化
された糖鎖認識部位 (CRD) の多様性を等しく保つようにした。具体的には、
5 500クローン規模のライブラリーから2.5 μ l (0.5 μ l \times 5チューブ)、
6000クローン規模のライブラリーから5.4 μ l (0.6 μ l \times 9)、10
00クローン規模のライブラリーから0.1 μ l (0.1 μ l \times 1)、1 \times 10
⁴クローン規模のライブラリーから1.0 μ l (1 μ l \times 1)、6 \times 10⁴クロー
ン規模のライブラリーから66.0 μ l (6 μ l \times 11)、1.5 \times 10⁴クロー
10 ン規模のライブラリーから1.5 μ l (1.5 μ l \times 1) が、8 \times 10⁴クロー
ン規模のライブラリーから32.0 μ l (8 μ l \times 4) を分取した。

上述のように調製したプラスミド (VIP36mixと称する) をBglII
による消化によって直鎖状にし、37℃で一晩保温した。その後、直鎖状にした
VIP36mixを1%アガロースゲル電気泳動し、ゲルから抽出した。消化後
15 のDNA濃度は475 ng/ μ lであった。

トランスフェクション当日に80~90%コンフルエントとなるよう、トラン
スフェクションの1日前に、Mardin Darbyイヌ腎細胞 (MDCK細胞
；ATCC寄託番号CCL-34) を継代培養した。

製造メーカーによって提供された手順に従って、VIP36mixプラスミド
20 をMDCK細胞にトランスフェクトした。4 μ g (すなわち、8.42 μ l) の
VIP36mixを15 ml チューブに加えた。その後、300 μ l のECバッ
ファー (QIAGEN、Effectene トランスフェクション試薬のキットに添付さ
れている) を加え、ボルテックスミキサーを用いて1秒間だけ穏やかに混和した。
その混合物を室温に4分間静置した。上記の混合物に48 μ l のE f f e c t e
25 n e 試薬 (QIAGEN) を加え、10秒間穏やかにボルテックスにかけた。そ
の混合物を再度室温で9分間静置した。DNA調製の際に、D10培地 (10% ウ
シ胎仔血清 (FCS)、10 mM HEPES及びペニシリン (100 U/ml)
ーstreptomycin (100 μ g/ml) を含むダルベッコ改変イーグル培地
(DMEM; Sigma) をデカンテーションし、プラスチックディッシュ (φ

- 100 mm) 中で培養したMDCK細胞を5 mlのPBS (リン酸緩衝化生理食塩水) で洗浄した。その細胞を7 mlの新しいD10培地に懸濁した。他方のチューブ内で、3 mlのD10培地を上述のように調製したDNA-試薬混合物に加え、2回のピペッティングによって穏やかに混和した。その混合物を、直ちに、
- 5 上記で準備したMDCK細胞に一滴ずつ滴下した。その細胞を5% CO₂ インキュベーター内で2日間37℃で培養した後、D10培地を新しく取り換え、うまくトランスフェクトされた細胞を選択するために、G418を添加した (最終濃度2.0 mg/ml)。ネオマイシン耐性細胞が増殖するまで、細胞を14日間静置した。pRc/CMV2ベクターは、うまくトランスフェクトされた時に発
- 10 現するネオマイシン耐性遺伝子を持っていた。トランスフェクションから14日後、2.0 mg/mlのG418の存在下で、約100のコロニーが形成された。

(2) LipofectAMINE™ 2000による安定なトランスフェクション

- 15 等量のVIP36 mixを上述のようにして調製した。トランスフェクションを行う際に95%コンフルエント以上になるよう、トランスフェクションの2日前に細胞を準備した。細胞は10 mlのD10培地中で培養した。

- トランスフェクション当日、24 µgのVIP36 mix DNA (すなわち、55 µlの439 µg/µl DNA) を15 mlのOptiMEM (登録商標)
- 20 I還元血清培地 (Gibco BRL) に希釈した。同時に、別の15 mlのOptiMEM (登録商標) I還元血清培地に75 µlのLipofectAMINE™ 2000試薬 (Invitrogen) を添加し、室温に5分間静置した。その後、別々の培地中のVIP36 mix DNAとLipofectAMINE™ 2000試薬との両方を混合し、室温に30分間静置した。VIP36 mix
- 25 DNAとLipofectAMINE™ 2000試薬が複合体を形成している間に、MDCK細胞を5 mlのPBSで2回洗浄し、13 mlのOptiMEM (登録商標) I還元血清培地を加えた。用意ができれば、3 mlのVIP36 mix DNAとLipofectAMINE™ 2000試薬の混合物を、直接、MDCK細胞に一滴ずつ添加した。プレートを前後に振とうした。細胞を5% CO

2 インキュベーター内で24時間37℃で培養した。

24時間の培養後、OptiMEM (登録商標) I 還元血清培地を除去し、2つのφ150mmディッシュに、D10培地22.5mlで、標準的な継代培養法を用いて継代培養した。24時間後、2つの15cmディッシュにG418を添加した (最終濃度2.0mg/ml)。G418耐性細胞を増殖させるため、細胞を5%CO₂インキュベーター内で10日間37℃で培養した。トランスフェクションから10日後、2.0mg/mlのG418の存在下で、細胞は約80%コンフルエントであった。

10 (3) 蛍光顕微鏡による変異VIP36の観察

MDCK細胞のトランスフェクション率を推定するために、蛍光顕微鏡のためのサンプルを作製した。マイクロカバーガラス (18×18mm、MATSUMAMI) を100%エタノール及びガスバーナーによって滅菌し、細胞を培養する前に、6ウェルプレートの各ウェルの底に置いた。サンプルあたり4×10⁴細胞を6ウェルプレート中で24時間培養した後、細胞をPBSで1回洗浄した。その後、細胞を固定するために、PBS中4.0%のホルムアルデヒドを1ml添加し、室温に1時間静置した。固定された細胞をPBSで1回洗浄し、抗体が細胞膜から浸透して細胞内の抗原に結合できるように、それらをPBS中0.3%のTriton X-100 (Sigma) 1mlで処理した。その後、細胞を20分間室温で静置し、続いて、PBSによる5分間の洗浄を3回行った。次に、PBS中5%のウシ血清アルブミン (BSA) 1mlを添加することによってブロッキングを行い、室温に15分間静置した。細胞をPBSで5分間3回洗浄した。カバーガラス周囲のPBSを拭き取った後、3mg/ml抗flag M2抗体 (IBI) から調製した5% BSA/PBS中の抗flag抗体 (2μg/ml) 200μlを、観察のために細胞を培養したカバーガラスに重層した。抗flag抗体を変異VIP36のflagタグに結合させるため、細胞を1時間室温に置いた。10分間3回洗浄し、上述のようにブロッキングを行った。次に、PBSで5分間3回洗浄し、200μlの5%BSA/PBS中フルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識化抗マウスIgG₁ (GAM-FITC、

Molecular Probe 社製； $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) をカバーガラスに重層し、GAM-F
ITCを抗flag抗体に結合させるため、1時間室温で静置した。その後、細胞
をPBSで10分間3回洗浄した。最後に、マイクロスライドガラス(MAT
SUNAMI)に、 $3 \mu\text{l}$ の 100mM DAPI (4', 6-ジエチルピロニジン-2-
5 フェニルインドールジヒドロクロライド, Molecular Probes) 及び $3 \mu\text{l}$ の
Slowfade (登録商標) Light Antifade Kit (Molecular Probes) の成分A (グリセ
ロールバッファー中の退色防止剤) を添加し、作製したカバーガラスを、細胞培
養面をスライドガラスに伏せて、スライドガラス上に置いた。サンプルはマニキュ
ア(Kanebo)によって密閉し、蛍光顕微鏡(Olympus BX52、
10 図4A~F)で観察した。

顕微鏡で捉えられた細胞のうち、792細胞中50細胞(6.3%)が変異V
IP36を過剰発現したことが示された。従って、推定トランスフェクト細胞数
は 2.0×10^6 細胞あたり 1.26×10^5 細胞であった。 2.0×10^6 とい
う数は、 $\phi 100 \text{mm}$ ディッシュ上のコンフルエント細胞を2~3回数えること
15 によって得られた。位相差像(図4A又はD)、蛍光像(図4B又はE)及び両
者を重ねた像(図4C又はF)の中の代表的な写真を、トランスフェクト細胞及
び野生型MDCK細胞それぞれに対して示す。

〔実施例3〕糖鎖に基づくトランスフェクト細胞の分離

20 (1) 植物レクチン

細胞表面に現れるオリゴ糖の独特の構造に基づいてトランスフェクトMDCK
細胞を分離するために、いくつかの植物レクチンを用いた。様々なタイプのオリ
ゴ糖を区別するために、10種類の植物レクチンを用いた。用いられたレクチン
の糖質特異性は、上記表1に示すように正確に解析されている。

25 レクチンに結合した細胞をストレプトアビジンマイクロビーズ(Milteny
yi Biotech、ストレプトアビジンと結合したコロイド状常磁性マイクロ
ビーズ)によって認識できるように、ビオチン化レクチン(Honon Co.)
を選択した。用いたレクチンは、ABAレクチン、ConAレクチン、DSAレ
クチン、LCAレクチン、Lotusレクチン、MAMレクチン、ホモ四量体E

ーサブユニットを持つPHA-E₄レクチン、ホモ四量体L-サブユニットを持つPHA-L₄レクチン、RCA120レクチン、及びWGAレクチンとした。数ある中からこれらのレクチンを選択したのは、これらのほとんどがN-結合型及びO-結合型オリゴ糖を認識することが知られているからであった。N-結合型オリゴ糖は本来のVIP36レクチンによって認識されると考えられた。磁気細胞分離法のために、1mg/mlのレクチンをPBSで希釈し（最終濃度5μg/ml）、25mM Acrodisc（登録商標）シリンジフィルター0.2μm（Pall Co.）を用いて濾過滅菌した。

10 （2）変異VIP36トランスフェクトMDCK細胞の磁気細胞分離法

細胞表面に提示される糖質に基づいて細胞を回収するために、磁気細胞分離法（MACS）、すなわち磁気で標識した細胞を標識されていない細胞と分離するシステムを選択した。MiniMACS、細胞及び高分子の分離のためのMACS分離装置は、Miltenyi Biotecから購入した。MiniMACSは、10⁷個の磁気標識細胞までの分離に適しており、MiniMACS分離ユニット、MACSマルチスタンド、及びMSカラムを一式を包含する。ビオチン化レクチン結合細胞の間接的な標識のために、ストレプトアビジンマイクロビーズ（ストレプトアビジンと結合したコロイド状常磁性マイクロビーズ）を用いた。

この実験に用いたバッファーは、製造メーカーによって記載されている、標識バッファー（2mM EDTAを含む1×PBS）及び分離バッファー（2mM EDTA及び0.5% BSAを含む1×PBS）とした。両バッファーは、25mM Acrodisc（登録商標）シリンジフィルター0.2μmを用いて濾過滅菌した。φ100mmディッシュで培養した細胞を懸濁するために、PBS-EDTA又はトリプシン-EDTAを用いた。

25 分離の当日に約80～90%コンフルエントになるよう、分離の1日前に、変異VIP36トランスフェクトMDCK細胞を増殖させた。細胞をPBSで2回洗浄し、トリプシン-EDTA又はPBS-EDTAのいずれかで20分間処理した。回収した後、細胞数を数えるため、細胞を2mlのD10培地に懸濁した。19G（1000rpm）で5分間遠心した後（以下のすべての遠心分離におい

て同一の遠心条件を適用した)、細胞を10 mlのPBSで1回洗浄した。再度遠心し、その後、細胞を15 mlのレクチン溶液(5 μ l/ml)に希釈した。氷上に30分間置いた後、レクチン結合細胞を遠心分離によって回収した。上清は、注意深く完全に吸引した。2次抗体の結合を最大限にするため、細胞の洗浄のために、300 μ l(又は1 ml)のラベリングバッファーを加えた。細胞は2回洗浄した。ビオチン化レクチンを結合させるために、10 μ lのストレプトアビジンマイクロビーズを加えた。溶液をよく混合し8℃で15分間静置した。その後、マイクロビーズ結合細胞を遠心分離によって回収して、500 μ lの分離バッファーに再懸濁し、以下の分離のために氷上に静置した。

- 10 分離過程を始める前に、MACSマルチスタンドに付いているMiniMACS分離ユニットにMSカラムを用意し、両方を70%エタノールで滅菌した。

細胞を分離するために、初めに500 μ lの分離バッファーを添加したMSカラムを用意した。その後、500 μ lの分離バッファー中のマイクロビーズ結合細胞をカラムに添加した。添加した溶液は自然流出によって通過させた。陰性細胞を含む通過画分を15 mlチューブに採取した。カラムを500 μ lの分離バッファーで3回洗浄した。洗浄過程においてカラムを通過した分離バッファーもまた、同じ15 mlチューブに回収した。その後、陽性細胞の回収のため、MSカラムをMACSマルチスタンドから移動させた。1 mlの分離バッファーの添加によって、カラム中の陽性細胞を新しい15 mlチューブに採取し、続いて直ちに、製造メーカーによって提供されたプランジャーを用いて陽性細胞を完全に洗い出した。陽性及び陰性の採取細胞は、血球計算板(Erma)によって数え、その結果を表2A及びBに示す。表中、トランスフェクトMDCK(A)及び(B)の欄に記載の数値は、それぞれ独立して(2回)トランスフェクションを行った結果である。

- 15 細胞を含む通過画分を15 mlチューブに採取した。カラムを500 μ lの分離バッファーで3回洗浄した。洗浄過程においてカラムを通過した分離バッファーもまた、同じ15 mlチューブに回収した。その後、陽性細胞の回収のため、MSカラムをMACSマルチスタンドから移動させた。1 mlの分離バッファーの添加によって、カラム中の陽性細胞を新しい15 mlチューブに採取し、続いて直ちに、製造メーカーによって提供されたプランジャーを用いて陽性細胞を完全に洗い出した。陽性及び陰性の採取細胞は、血球計算板(Erma)によって数え、その結果を表2A及びBに示す。表中、トランスフェクトMDCK(A)及び(B)の欄に記載の数値は、それぞれ独立して(2回)トランスフェクションを行った結果である。

表2

A:植物レクチンにより分離されたトランスフェクト細胞数($\times 10^5$)

細胞型 MACS 分画	トランスフェクト MDCK(A)		トランスフェクト MDCK(B)		野生型 MDCK	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
ConA	16	1.6	2.1	5.7	4.4	0.4
LCA	11	12	3.2	3.5	3.3	1.4
PHA-E ₄	0.8	22	3.5	0.55	3.3	1.6
RCA120	no cell	no cell	n/a	n/a	n/a	n/a
WGA	13	24	5.2	6.2	2.3	1.65
ABA	9.2	18	5.8	12	4.3	0.85
PHA-L ₄	16	9.2	1.6	2.1	1.85	2.95
MAM	17	20	0.38	22	0.85	4.55
Lotus	n/a	n/a	0.68	23	0.2	4.95
DSA	n/a	n/a	5	21	4.05	0.6

B:植物レクチンにより分離された陽性細胞及び陰性細胞の比率

細胞型 MACS 分画	トランスフェクト MDCK(A)		トランスフェクト MDCK(B)		野生型 MDCK	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
ConA	90.9	9.1	26.9	73.1	91.7	8.3
LCA	47.8	52.2	47.8	52.2	70.2	29.8
PHA-E ₄	3.5	96.5	86.4	13.7	67.3	32.7
RCA120	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
WGA	35.1	64.9	45.6	54.4	58.2	41.8
ABA	33.8	66.2	32.6	67.4	83.5	16.5
PHA-L ₄	63.5	36.5	43.2	56.8	38.5	61.5
MAM	45.9	54.1	1.7	98.3	15.7	84.3
Lotus	n/a	n/a	2.9	97.1	3.9	96.1
DSA	n/a	n/a	19.2	80.8	87.1	12.9

5

上述のすべての手順を、検査される10種類のレクチン、すなわち、ConA、LCA、PHA-E₄、WGA、ABA、PHA-L₄、MAM、RCA120、Lotus及びDSAレクチンの各々に適用した。これらのうち初めの7種類のレクチンに対しては、実験は独立に2回行った。

- 10 分離された細胞は、レクチン陽性又はレクチン陰性分画として回収した。陽性と陰性の両分画で回収された細胞の数を血球計算板(表2A)で数え、分離の比

率は表 2 B に示した。計算された比率は、1 回目の実験における PHA-E₄ の分離比は 2 回目で逆になることを示した (表 2 B の 3 列目)。MAM による陽性分画の比率は、2 回目の実験では回収された全細胞の 45.5% から 1.7% にまで減少した (表 2 B の 8 列目)。野生型 MDCK の分離比と比較すると、Lotus による陽性分画は、トランスフェクト細胞及び野生型 MDCK 細胞表面の分離において、回収された全細胞の 2.9% 及び 3.9% という結果であった (表 2 B の下から 2 列目)。これは、フコース残基が細胞上にほとんど現れていないことを示唆する可能性がある。DSA レクチンによる分離は、陽性に回収されたトランスフェクト細胞が野生型のものより少ないことを示している (表 2 B の最
5 10 下列)。

1 回目の実験が行われた時 (表 2 A 及び B 中の (A) の結果)、PHA-E₄ レクチンは全回収分の 3.5% を共有した陽性分画として選ばれた。陽性分画の糖質の特異性はまた、フローサイトメトリー解析 (実施例 4 参照) によっても観察された。

(3) PHA-E₄ 及び WGA 陽性トランスフェクト細胞の多重磁気細胞分離法

上記 (2) の分離法よりも更に大規模に各細胞グループを分離するために、2 つのグループの変異 VIP 36 トランスフェクト MDCK 細胞を 2 回目、3 回目の磁気細胞分離法に進めた。選択したトランスフェクト細胞の 1 つのグループは
20 PHA-E₄ レクチン陽性細胞であり、他方は WGA 陰性細胞であった。これらの 2 つの細胞グループを、上述の手順で 3 回、MiniMACS による分離にかけ、前者は陽性細胞の後者は陰性細胞のそれぞれ濃縮を行った。同様に、3 回の磁気細胞分離を行った。細胞グループの両方を血球計算板によって数えた (表 3)。

表3

PHA-E₄及びWGAにより分離された細胞数(×10⁵)

MiniMACS 番号	MiniMACS, 第1回目		MiniMACS, 第2回目		MiniMACS, 第3回目	
MACS 分画	陽性	陰性	陽性×2	陰性×2	陽性×3	陰性×3
PHA-E ₄	0.8	2.2	4.5	4	3.8	10.6
WGA	5.2	6.2	4.8	4.2	6.7	1.1

(4) 野生型MDCK細胞の磁気細胞分離法

- 5 野生型のMDCK細胞を上述の手順によってMiniMACSで調べた。細胞は上述のように数え、表2に示した。使用したビオチン化レクチンは、ConA、LCA、PHA-E₄、WGA、ABA、PHA-L₄、MAM、Lotus及びDSAレクチンであった。

10 [実施例4] フローサイトメトリーによる細胞表面の糖鎖解析

(1) トランスフェクト及び野生型MDCK細胞の両分離細胞のフローサイトメトリー

- 本実施例では、変異VIP36遺伝子の過剰発現に伴う細胞の糖鎖構造を研究するため、フローサイトメトリー解析を行った。ビオチン化レクチンとそれに次
- 15 ぐストレプトアビジン-FITCで染色した細胞の蛍光強度を測定し、ヒストグラムに記録した。MiniMACSによって、1回目、2回目又は3回目に陽性に分離されたトランスフェクト細胞、及び1回目、2回目又は3回目に陰性に分離されたトランスフェクト細胞を解析した。MiniMACSによって陽性又は陰性に分離された2つのグループの野生型MDCK細胞もまた、これらのトラン
- 20 スフェクト細胞と比較するために解析した。MiniMACS分離によって調製した、合計53個の独立したMDCK細胞グループを用いた。各レクチン(9種類のレクチン; ABA、ConA、DSA、LCA、Lotus、MAM、PHA-E₄、及びWGA)に対して、トランスフェクト細胞と野生型MDCK細胞との両方(2つの細胞型)の、レクチン陽性及び陰性グループ(2つのグループ)
- 25 の小計が36グループとなった。多重磁気分離法によって得られた濃縮細胞グループの小計は8グループであった。9種類のレクチンに対する対照MDCK細胞

の小計が 9 グループとなった。

解析時に細胞がコンフルエントに達しないよう、フローサイトメトリー解析の前日、各グループのMDCK細胞を 6 cm ディッシュにおいて 4 ml の D 1 0 培地中で培養した。

- 5 解析の当日、各ディッシュの細胞を PBS で 2 回洗浄し、次いで、5 % CO₂ インキュベーター内で 37℃ 30 分間、500 μ l の PBS-EDTA (又はトリプシン-EDTA) で処理した。懸濁した 250 μ l の細胞を 96 ウェルプレートに移し、51 G (1800 rpm) で 1 分間遠心した (以下のすべての遠心分離において同一の遠心条件を適用した)。その後、細胞を 200 μ l の FACS
- 10 S バッファー (0.1 % BSA 及び 0.1 % アジ化ナトリウムを含む HBSS (Gibco BRL)) で洗浄した。1 次染色のため、50 μ l の各レクチン (10 μ g/ml) を各々の適切なウェルに添加し、氷上に 30 分間静置した。レクチン結合反応後、100 又は 200 μ l の FACS バッファーで洗浄し、遠心及びデカンテーションを 3 回行った。雑菌混入を避けるため、FACS バッファーの
- 15 デカンテーションは慎重に素早く 96 ウェルプレートを転倒することによって行った。2 次抗体の結合は、50 μ l のストレプトアビジン-FITC (20 μ g/ml) の添加と氷上での正確に 30 分間の静置によって行った。150 又は 200 μ l の FACS バッファーによる洗浄の後、各細胞ペレットを 200 μ l の FACS バッファーに懸濁し、1.2 ml チューブ (Marsh Biomedical Products)
- 20 に移した。3 μ g/ml のヨードプロピジウム (PI, Sigma) 100 μ l の添加後、細胞を FACS caliber (登録商標) (Becton Dickson) によって解析した。コンピューターによるデータ解析は Cell Quest (登録商標) (Becton Dickson) プログラムを用いて行った。結果を図 5 及び 6 に示す。

- 25 変異 VIP 36 トランスフェクト細胞の場合には、大部分の分離細胞は、1 回目の実験に対する分離比に有意差を示さなかった。この結果は、同じレクチンを用いたフローサイトメトリー解析によって裏付けられた (図 5)。本実施例においては、上記表 3 から陰性と陽性の細胞の割合に差がわずかなレクチンに関しては MACS を用いた細胞の選別は非常に良好とはいえなかったため、実施例 12 に記載するように FACS を利用したところ、細胞を良好に選別すること

ができた。しかし、MACSを用いた場合でもPHA-E₄+及びTFPHA-E₄-細胞は明らかに固有の分離比で分離した。測定した相対的蛍光強度の平均値は、TFPHA-E₄+で1786.00、TFPHA-E₄-で649.30であった。一方、野生型ではそれぞれ、1034.20及び1127.68であった。非分離野生型MDCK細胞の平均値は852.76であった。本明細書中、「TF」とはトランスフェクトした細胞から分取したものを表す。TFPHA-E₄+及びTFPHA-E₄-細胞の両方は更にMiniMACS分離によって濃縮し、フローサイトメトリーによって解析した。結果は、TFPHA-E₄+ (2回のMiniMACS分離後回収された陽性細胞、同一の省略形を以下に適用する) 及びTFPHA-E₄-の平均値が、それぞれ1135及び660であることが示された(図6)。

(2) PBS-EDTA又はトリプシン-EDTA処理の影響

細胞を1次染色のために懸濁する際、細胞表面の糖鎖形成へのトリプシンの影響を調べるために、2つの独立の野生型MDCK細胞グループをそれぞれPBS-EDTA又はトリプシン-EDTAで処理した。フローサイトメトリーの手順は上記(1)と同様に行った。結果を図7に示す。

用いられた9つのレクチンのうち8つのレクチンは結合親和性において有意差を示さなかったが、一方、Lotusレクチンで染色された細胞はトリプシン処理された細胞により高い結合親和性を示した(図7)。加えて、トリプシン処理した細胞はPIでほとんど染色されず、大部分の細胞が実験中に死ななかったことを示唆している(図7の右下枠内)。

上記実施例1~4においては、分泌経路において糖タンパク質輸送を担うVIP36にランダム突然変異を導入することによって、細胞表面の糖鎖形成を改変する実験を行った。

フローサイトメトリー解析でのレクチンの使用によって、MDCK細胞は高度に多様なオリゴ糖を持つことが示された。PHA-E₄レクチンによって分離されたトランスフェクトMDCK細胞は明らかにレクチン結合活性に有意差を示し、

レクチンによる選択を繰り返すことにより特定の糖鎖に対する特異性が増強した細胞のクローンを濃縮可能であることが示された。

〔実施例 5〕 E R G I C - 5 3 のためのランダム変異導入用 P C R プライマ

5 ーの設計

E R G I C - 5 3 の推定糖鎖認識決定部位にランダムな改変を導入するにあたって、実施例 1 に記載の V I P 3 6 の場合と同様に二段階に分けて行う P C R 法を用いることとした。図 8 が、設計したプライマーと E R G I C - 5 3 との相関図である。③は推定糖鎖認識決定部位をランダム化するランダムプライマーとして設計した。①と②のプライマーを用い、E R G I C - 5 3 を鋳型として P C R を行い、生成される DNA フラグメント (E R G I C - 5 3 の糖鎖認識決定部位を含まない前半部分、以下 E R G I C - F と呼ぶ) を p R C - C M V 2 - C D 8 - F L A G (p R C - C M V 2 に C D 8 のシグナル配列と F L A G タグを付けたベクター) に組み込む。その後、③のランダムプライマーと④のプライマーを用い、E R G I C - 5 3 を鋳型として P C R を行うことにより生成される DNA フラグメント (E R G I C - 5 3 の糖鎖認識決定部位を含む後半部分、以下 E R G I C - B - r a n d o m と呼ぶ) を E R G I C - F が挿入されている p R C - C M V 2 - C D 8 - F L A G に導入する、という手法で E R G I C - 5 3 ランダムライブラリーを作製した。この手法においてランダム変異導入した部位は P C R で増幅されることはないため、片寄りなく多種の変異を導入することが可能である。

作製したプライマーの名称及び塩基配列は、以下の通りである：

① E R G I C - F F (下線部分は H i n c I I サイト)

5' -GTACGTGACGGCGTGGGAGGAG-3' (配列番号 1 2)

25 ② E R G I C - F R (下線部分は X b a I サイト)

5' -CGTATCTAGAAATATTCCAACACCATTCCTCA-3' (配列番号 1 3)

③ E R G I C - B F (下線部分は X b a I サイト、K は G 若しくは T、X は A、T、G、C のいずれかに相当する)

5' -CGTATCTAGATXXXXXXKAATXXXXXXKAATAATCCTGCTATAGTAATTAT-3' (配

列番号 14)

④ ERGIC-BR (下線部分は B f r I サイト)

5'-CGTACTTAAGTGGTAGTCAAAAGAATTTTTTG-3' (配列番号 15)

5 〔実施例 6〕 ERGIC-53 ランダムライブラリーの作製

(1) プラスミド pRC/ERGIC-F の作製

pBluescript に組み込まれた ERGIC-53 を鋳型として PCR 法を行い、ERGIC-53 の糖鎖認識部位を含まない前半部分、ERGIC-F の遺伝子の増幅を行った。プライマーは、上記実施例 5 で設計したものを用い、
10 フォワードプライマーには ERGIC-FF、リバープライマーには ERGIC-FR を用いた。PCR 反応液は、フォワードプライマー ERGIC-FF 2 μ l、リバープライマー ERGIC-FR 2 μ l、テンプレート ERGIC-53 (1 ng/ μ l) 2 μ l、25 mM MgSO₄ (TOYOBO) 3.2 μ l、2 mM dNTPs (TOYOBO) 4 μ l、10 \times PCR Buffer for KDD-PLUS (TOYOBO) 4 μ l、KDD-PLUS DNA ポリメラーゼ (TOYOBO) 0.8 μ l、Milli-Q 水 22 μ l を混合したものである。PCR 反応は、94 $^{\circ}$ C にて 2 分間、(94 $^{\circ}$ C にて 15 秒、52 $^{\circ}$ C にて 30 秒、及び 68 $^{\circ}$ C にて 1 分間) \times 30 サイクル、68 $^{\circ}$ C にて 7 分間の条件で行った。なお、両プライマーはあらかじめリン酸化しておいたものを用いた。PC
15 R 産物から、1% アガロースゲルを用いた電気泳動 (Mupid-21 ミニゲル泳動槽：コスモバイオ株式会社) により目的のフラグメント ERGIC-F を分離し、GeneClean Spin Kit (BIO101) で精製したものをインサートフラグメントとした。

pBluescript II SK (+) を Sma I (TOYOBO) で制限
25 酵素処理し、これを脱リン酸化 (大腸菌由来 アルカリホスファターゼ (BAP) 処理) した後、フェノール/CHCl₃ 抽出し、エタノール沈殿して得たものをベクターとして使用した。

上記ベクター pBluescript II SK (+) Sma I カット済と、インサート DNA フラグメント ERGIC-F をモル比 1 : 10 の割合で混ぜ、

ライゲーションを行った。ライゲーション後の反応液を、 CaCl_2 法によりコンピテントセルJM109に形質転換（トランスフォーメーション）し、LB-Ampプレートにまいた。

プレートに生えてきた青と白のコロニーのうち、白色のコロニーのみを数個選
5 んでLB液体培地3ml（終濃度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン入り）で終夜培養し、アルカリプレップ法によりプラスミドを抽出した。これに対してインサートチェックを行った結果、インサートDNAフラグメントがベクターに入っていることが分かったコロニーに対し、Plasmid Mini Kit（QIAGEN）を用いて再度プラスミド抽出を行い、DNAシーケンサー（LI-COR）
10 R）にてインサートDNAフラグメントの配列を確認した。

得られたDNAフラグメント6個中3個は正しい塩基配列であることが確認できた。そのうちの1つを、本実施例において得ることを目指したベクターとし、以降の実験に用いた。

正しい配列のインサートDNAフラグメントがベクターに入っているプラスミドを選択し、HincII（TOYOBO）とXbaI（TOYOBO）で制限
15 酵素処理した後、1%アガロースゲルに電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）にて目的のDNAフラグメントERGIC-Fを精製した。

RC-CMV2-CD8-FLAG（pRC-CMV2にCD8のシグナル配
20 列とFLAGタグを付けたベクター）をHpaI（TOYOBO）とXbaI（TOYOBO）で制限酵素処理した後、1%アガロースゲルに電気泳動し、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）で精製した。

前述のベクターpRC-CMV2-CD8-FLAG（HpaI、XbaIカ
25 ット済）と、上記DNAフラグメントERGIC-Fをモル比1：10の割合で混ぜ、ライゲーションを行った。ライゲーション後の反応液を、 CaCl_2 法によりコンピテントセルJM109に形質転換（トランスフォーメーション）し、LB-Ampプレートにまいた。

プレートに生えてきたコロニーのうち数個を選び、コロニーPCR法によりインサートチェックを行った。その結果インサートが入っていることが分かったも

のが、ベクターpRC-CMV2-CD8-FLAGにERGIC-Fが組み込まれた目的物であった。これを今後pRC/ERGIC-Fと呼ぶことにした。

以降の実験に用いるために、pRC/ERGIC-FをPlasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製した。また、pRC/ERGIC-Fのグ

5 リセロールストックを作製し、-80℃の冷蔵庫で保管した。

(2) pRC/ERGIC-Randomの作製

上記(1)に記載の方法と同様に、ERGIC-53を鋳型としたPCR法を行って、ERGIC-53の糖鎖認識部位を含む後半部分、ERGIC-Bラン
10 ダムの遺伝子を増幅した。フォーワードプライマーにはERGIC-BF、リバースプライマーにはERGIC-BRを用いた。PCR反応は、94℃にて2分間、(94℃にて15秒、54℃にて30秒、及び68℃にて1分間)×30サイクル、68℃にて7分間の条件で行った。

目的のフラグメントERGIC-Bランダムを分離した後、QIAquick
15 Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。

この後、XbaI (TOYOBO) とBfrI (TOYOBO) で制限酵素処理し、1%アガロースゲルを用いた電気泳動を行い、QIAquick Gel
Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。これをインサートDNA
Aフラグメントとした。

20

上記(1)において作製したベクターpRC/ERGIC-Fを、XbaI (TOYOBO) とBfrI (TOYOBO) で制限酵素処理し、0.8%アガロースゲルを用いた電気泳動により目的のフラグメントを分離し、QIAquick
Gel Extraction Kit (QIAGEN) で精製した。以降、これ
25 をベクターとして用いた。

前述のベクターpRC/ERGIC-F (XbaI、BfrIカット済) と、インサートDNAフラグメントERGIC-B-randomをモル比1:6の割合で混ぜ、ライゲーションを行った。ライゲーション後の反応液を、CaCl₂法によりコンピテントセルJM109に形質転換(トランスフォーメーション)

し、LB-Ampプレートにまいた。

プレートに生えてきたコロニーから24個を無作為に選択し、3mlのLB液体培地（終濃度 $100\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようにアンピシリンを添加）中で終夜培養し、アルカリプレップ法によりプラスミド抽出を行った。その後、ApaI（TOYOBO）とHindIII（TOYOBO）の2つの制限酵素でプラスミドを切断し、1%アガロースゲルで電気泳動することによりインサートチェックを行った。選択した24個中21個にインサートが入っていた。

インサートチェックの結果、インサートDNAフラグメント（ERGIC-Random）がきちんと入っていたものに対して、再度プラスミド抽出（Plasmid Mini Kit（QIAGEN）使用）を行った。pRC/ERGIC-Fに導入されたインサートDNAフラグメント（ERGIC-Random）の部分に対し、PCRによるランダムマイズが確実に行われているかを確認するためにDNAシーケンス解析を行った。今回解析したいDNA塩基配列はERGIC-53の推定糖鎖認識決定部位であり、9アミノ酸分と短いものであったので、ABIシーケンサーで解析した。配列解析の結果、全てのプラスミドの推定糖鎖認識決定部位の塩基配列が異なっていた。

（3）ERGIC-53ランダムライブラリーの構築

上記（2）においてpRC/ERGIC-Random、正確には推定糖鎖認識決定部位にランダム変異が導入されたERGIC-53が、ベクターpRC-CMV2-CD8-FLAGに組み込まれたもの、を作製した。推定糖鎖認識決定部位の9アミノ（DTFDNDGKK）のうち7アミノ酸をランダムマイズ（DXXNXXXX、Xは任意のアミノ酸を表す）したが、本発明においてはこの推定糖鎖認識決定部位に種々のアミノ酸を持つものを多数作る必要があった。そこで、pRC/ERGIC-Randomライブラリーを作製した。なお、以降このライブラリーを、ERGICランダムライブラリーと呼ぶこととした。

（3-1）ERGICランダムライブラリー作製にあたっての条件検討

上記（1）で作製したベクターpRC/ERGIC-Fと上記（2）で作製したインサートDNAフラグメントERGIC-Randomをライゲーション

ンする時に、ベクター：インサートのモル比を1：2、1：3、1：6、及び1：10と4段階に設定し、コンピテントセルJM109に形質転換（トランスフォーメーション）した。なお、ベクター（約6 Kb）は265 ng/ μ l、インサート（約1 Kb）は520 ng/ μ lの濃度のものを使用した。

- 5 形質転換時に、コンピテントセルに入れるライゲーション後のDNAの量を、コンピテントセル50 μ lに対し、2 μ l、3 μ l、5 μ lと変更した。

形質転換に用いるコンピテントセルを、JM109とDH5 α の2種類用いて、効率の比較を行った（両方ともCaCl₂法のコンピテントセルである）。なお、ライゲーション時のベクター：インサートのモル比は1：6で行った。

- 10 実験の結果、コロニーが生えてきた個数は、ベクター：インサートが1：10のものが一番多かったため、ベクター：インサートが1：10を最適モル比とした。また、DNAの量を検討したところ、50 μ lのコンピテントセルに対し、5 μ lの場合が一番コロニー数が多かった。従って本実験では、コンピテントセル50 μ lにつき5 μ lのライゲーション後のDNAを用いることとした。さら
- 15 に、DH5 α を用いた場合の方がJM109を用いた場合と比較して5倍の数のコロニーが生えた。ゆえに、DH5 α を用いることとした。

（3-2）ERICランダムライブラリーの回収

- LB-Ampプレート上に生えてきたコロニーの個数を、1枚のプレートごと
- 20 に数えた。

- 個数をカウントしたプレートに生えているコロニーの中から、無作為に24個のコロニーを確認用にピックアップした。この確認用コロニーは、3 mlのLB液体培地（100 μ g/mlアンピシリン入り）で終夜培養し、プラスミド抽出を行い、インサートチェック（ApaI、HindIIIの制限酵素で処理し、
- 25 1%アガロースゲルにて電気泳動）を行った。インサートが入っていると確認されたプラスミドのうち、無作為に6個を選び、DNAシーケンサーによるシーケンス確認（糖鎖認識決定部位にランダム変異が導入されているかどうかの確認）を行った。インサートチェックとDNAシーケンスの結果から、プレートに生えてきたコロニーのうちの有効コロニーの確率を計算した。

確認用コロニー以外のものは、すぐさま回収を行った。この回収したもののうち、上記方法で算出した有効数のものをE R G I Cランダムライブラリーとした。回収の具体的な方法は後述する。

5 L B - A m p プレート1枚あたり15mlのLB液体培地(100 μ g/mlアンピシリン入り)を加え、コンラージ棒で物理的にコロニーを剥がし取り、37℃で終夜振とう培養した。その後、培養液の一部(400 μ l)はグリセロールストックとしてプレート1枚ごとに保存した。残りの培養液はP l a s m i d M i n i K i t (Q I A G E N)にてプラスミド抽出した。なお、プラスミド抽出は数枚のプレートをまとめて行ったが、この際各プレートに生えたコロニーの
10 個数に比例するように培養液を混合した(1枚に1000個のコロニーが生えたプレートの回収後培養液と、100個のコロニーが生えたものの回収後培養液の場合、前者は後者の10倍の液量を用い、プラスミドを抽出した)。

回収されたコロニー数は約238,000であった。この中から、回収時に無作為に選んだ確認用コロニーをインサートチェック及びDNAシーケンスで確
15 認したところ、平均して24個中20個にインサートが含まれ、推定糖鎖認識決定部位はDNAシーケンスで確認したプラスミドに関してはそれぞれ異なる塩基配列になっていた。そのため、有効コロニー数は、回収したコロニー238,000のうち20/24、約200,000とした。したがって、今回作製したE R G I Cランダムライブラリーのサイズは 2×10^5 であった。これらのライ
20 ブラリーは、プレート1枚ごとに一本グリセロールストックを作製し、-80℃の冷蔵庫で保存した。また、約5000個を一つにまとめてプラスミド抽出を行い、-20℃に保存した。以降の実施例においては、このプラスミドを実験に使用した。

25 [実施例7] E R G I CランダムライブラリーのMDCK細胞を用いた発現
本実施例においては、実施例6で作製したE R G I Cランダムライブラリーを、MDCK細胞にトランスフェクションし、発現させた。その後、ウエスタンブロッティング法(実施例8)、間接蛍光抗体法(実施例9)により発現確認を行った。

(1) トランスフェクション効率の検討

MDCK細胞にERGICランダムライブラリーをトランスフェクションする前に、条件検討を行った。具体的には、Effecteneトランスフェクション試薬(QIAGEN)及びLipofectamine™ 2000試薬(Invitrogen)を使用し、pIRES-EGFP(CLONTECH)をMDCK細胞にトランスフェクトし、EGFP遺伝子を一過的に発現させた。その後、蛍光標示式細胞分取器(以下FACSという)を用いて蛍光強度を測定することによりトランスフェクションの効率を検討した。

- 10 (1-1) Effecteneトランスフェクション試薬を用いた効率検討
0.526 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のpIRES-EGFP(CLONTECH)を用いて、Effecteneトランスフェクション試薬(QIAGEN)の発現効率を検討した。

- 15 具体的には、トランスフェクションの前日に6ウエルプレート(FALCON 3046)に 4×10^5 の細胞をまき、37℃、5%CO₂で一晩培養した。当日、プレートから培地(DMEM(SIGMA)500ml、非動化ウシ胎仔血清(FBS; INTERGEN)55.5ml、10mM HEPES 5ml、ペニシリン(100U/ml)ーstreptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 5mlを混合したもの)を吸い取り、一回1×PBS(1ml)で細胞を洗い、新しい培地を1.6ml加えた(①)。

- 25 一方、15mlチューブにプラスミドDNAを加え、バッファーECで合計100 μl にした。これに促進剤(QIAGEN、Effecteneトランスフェクション試薬のキットに添付されている)を加え、1秒間ボルテックスで攪拌し、2～5分室温に置いたあとスピンドウンした。次に、Effecteneトランスフェクション試薬を加え、10秒間ボルテックスし、5～10分室温で放置し、その後600 μl の培地を加え、ピペティングした(②)。

上記①に②を加え、37℃で48時間培養した。薬剤での選択を行う場合は、トランスフェクション後48時間経過してから添加した。

また、トランスフェクションの48時間後に、FACSにて発現効率を比較し

た。具体的には、トランスフェクション後48時間経過した細胞をPBSで2回洗淨したのち、PBS-0.5mM EDTAを2ml加え、37℃、5%CO₂で培養することにより細胞をはがした。細胞がはがれたらFACSバッファ- (HBSS (ハanks平衡化塩溶液、日水製薬株式会社) 9.8gをMilliQに溶かし、NaHCO₃ 0.35g、10%NaN₃ 10ml、20%BSA/NaN₃ 溶液5mlを加えて1Lに調整した) を2ml加え、15mlチューブに移し、190×gで10分間遠心した後、上清を捨てた。さらにFACSバッファ- 2mlで細胞を一回洗淨し、細胞数を測定した後、190×gで10分間遠心し、上清を捨てた。

- 10 細胞が 8×10^6 個/mlになるようにFACSバッファ-で希釈し、希釈液をFACSチューブへ移した。3μg/mlのヨードプロピジウム (SIGMA) を細胞希釈液の1/2量加え、死細胞を染色した。細胞は、FACSCaliburを用いたCell Quest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) により解析した。前方散乱光、側方散乱光、ヨードプロピジウム (SIGMA) の染色により生細胞を選別し、10000個の生細胞の情報を収集、解析した。なお、今回は導入したpIRES-EGFP (CLONTECH) のGFP (緑色蛍光タンパク質) が持つ蛍光を検出し、解析を行った。

その結果、0.8μg/DNA、6.4μl促進剤、8μl Effectene トランスフェクション試薬、99.5μlバッファ-ECの試薬量を用いた際の効率 (3.65%) が最も良い効率であることがわかった。

- (1-2) Lipofectamine™ 2000 試薬を用いた効率検討
0.526μg/μlの濃度のpIRES-EGFP (CLONTECH) 4μg/分を用いて、Lipofectamine™ 2000 試薬 (Invitrogen) の発現効率を検討した。

具体的には、トランスフェクション前日に6ウェルプレート (FALCON 3046) に 4×10^5 の細胞をまき、37℃、5%CO₂で一晩培養し、当日90~95%コンフルエントになるようにした。

一方、プラスミドDNA 4μgを、250μlのOpti-MEM (Invitrogen)

trogen、Lipofectamine™ 2000試薬キットの中に添付されているもの)に希釈した(①)。10 μ lのLipofectamine™ 2000試薬を250 μ lのOpti-MEMに希釈し、室温で5分培養した(②)。①と②を混合し、室温で20分静置培養することにより、DNA-Lipofectamine™ 2000試薬複合体が形成されるので、これを細胞に添加し、24時間37℃、5%CO₂で培養した。

トランスフェクション後24時間経過した後、培地を新しいものに交換し、さらに24時間培養した。薬剤での選択を行う場合は、トランスフェクション後48時間経過してから添加した。

10 また、トランスフェクションの48時間後に、上記(1-1)と同様にFACSで解析を行った。

その結果、トランスフェクション効率は8.20%であった。従って、以降のトランスフェクションはLipofectamine™ 2000試薬(Invitrogen)を用いて行うこととした。

15

(2) ERGICランダムライブラリーの発現

本実施例では、実施例6で作製したERGICランダムライブラリーをLipofectamine™ 2000試薬(Invitrogen)を用いてMDCK細胞にトランスフェクションを行った。この際、ERGICランダムライブラリーは制限酵素処理により線状化したものをトランスフェクションした。

20 実施例6で作製したERGICランダムライブラリー全て(2 \times 10⁵)をScaIで制限酵素処理し、QIAquick Nucleotide Removal Kit(QIAGEN)にて精製した。なお、ERGICランダムライブラリーであるが、全てのコロニーが同じ割合で含まれるように計算して混ぜ合わせたものを使用した(500個のコロニーを回収して得たプラスミドと、5000個のコロニーを回収して得たプラスミドの場合、それぞれの濃度を測定し、後者が前者の10倍のDNA量になるようにした)。精製後、分光光度計(JASCO、V-550)を用いて濃度を測定した。

トランスフェクション前日に6ウェルプレート(FALCON、3046)に

MDCK細胞を 4×10^5 個まき、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で一晩培養した。上記細胞にERGICランダムライブラリー（Scalカット済）を1ウエルあたり $4 \mu\text{g}$ Lipofectamine™ 2000試薬（Invitrogen）を用いてトランスフェクトし、24時間 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で培養した。

- 5 トランスフェクションから24時間後、培地を新しいものに交換し、さらに24時間 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で培養した。

トランスフェクションから48時間後、 1.5mg/ml のG418を含む培地に交換し、選択を開始した。選択開始後、一日一回は細胞を観察し、選択の進み具合を確かめた。

- 10 選択開始から10日後、 1.5mg/ml のG418を含む培地中で増殖してきた細胞を、トランスフェクションが確認された細胞であるとして、トリプシン-EDTA（SIGMA）処理して細胞をプレートからはがした後、細胞数を数えた。

- 15 G418添加後10日目にはプレート一面が細胞に覆われていた。そこで、細胞数を計算したところ、6ウエルプレート1枚で 9.5×10^6 個であった。以降、この細胞の一部を用いて、ウエスタンブロッティング法（実施例8）及び間接蛍光抗体法（実施例9）による発現確認を行うこととした。

〔実施例8〕 ウエスタンブロッティング法を用いた発現確認

- 20 上記実施例7においてMDCK細胞にトランスフェクトし、G418で選択を行って得たものに、ERGICランダムライブラリーが正しく発現しているかどうかを、ウエスタンブロッティング法を用いて確認した。なお、コントロールには何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。

- 25 実施例7においてG418での選択後10日目の細胞の一部を24ウエルプレート（FALCON、3047）に移し、ウエルが細胞でいっぱいになるまで 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で培養した。また、コントロールに使用するMDCK細胞も24ウエルプレート（FALCON、3047）にまき、同様に培養した。

ウエルが細胞でいっぱいになったらトリプシン-EDTA（SIGMA） $50 \mu\text{l}$ を加え、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で20分程度培養することにより細胞をはがし

た。はがれた細胞に培地を $500\mu\text{l}$ 加え、 1000rpm で5分間遠心し、上清を捨てた。残ったペレットを $1\times\text{PBS}$ で2～3回洗浄した。

洗浄済みの細胞のペレットを $50\mu\text{l}$ の $1\times\text{PBS}$ で懸濁し、そこに $2\times\text{SDS}$ 可溶化バッファー (還元) を $25\mu\text{l}$ 加え、 100°C で5分間熱処理し、 12.5%

5 5% ポリアクリルアミドゲルを使用して、 200V で45分間電気泳動した。なお、マーカーとして、タンパク質分子量マーカー「第一」III (第一化学薬品) を使用した。

ウエスタンブロッティング法を用いて、上述の通り電気泳動したタンパク質を PVDF 膜 (ImmobilonTM Transfer Membranes, Millipore) へ 100V で60分
10 間かけて転写した。転写後、マーカー部分を切り取り、CBBで染色、脱染色を行った。残りの膜はブロッキング溶液に浸して 4°C で一晩放置した (膜が均一にブロッキング溶液に浸るように、振とうした)。

ブロッキング後の膜をハイブリバッグソフト (コスモバイオ) に入れ、抗体と反応させた。1次抗体としては、抗FLAG抗体 ($m2\text{Ab}$ 、IBI) を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にブロッキング溶液で希釈した溶液 (4.5ml) を用い、室温で
15 2時間反応させた。その後、洗浄バッファーで5分間 $\times 3$ 回洗浄し、2次抗体と反応させた。2次抗体にはヤギ抗マウスアルカリホスファターゼコンジュゲート (BIORAD) を 3000 倍希釈の濃度にブロッキング溶液 (5% スキムミルクを $\text{TBS}-\text{Tween } 20$ を用いて調整したもの) で希釈した溶液 (4.5ml)
20 $1)$ を用い、室温で30分間反応させた。その後、洗浄バッファーで15分間、5分間 $\times 2$ 回の計3回洗浄した。洗浄後、膜を発色基質溶液に浸し、膜にバンドが見えるまで放置した。発色基質溶液は、Milli-Q中、 $100\text{mM Tris}-\text{HCl}$, $\text{pH } 9.5$ 、 100mM NaCl 、及び 5mM MgCl_2 を含むアルカリホスファターゼ基質バッファー 5ml にNBTストック溶液 (NBT 50mg を 70% DMF (N, N-ジメチルホルムアミド) 1ml に溶解して -20°C で保存したもの) $33\mu\text{l}$ 及びBCIPストック溶液 (BCIP 25mg を 50% DMF 1ml に溶解して -20°C で保存したもの) $34\mu\text{l}$ を添加して調製した。発色をとめたいところで水道水で膜を洗い、風乾した。

MDCK細胞にERGICランダムライブラリーをトランスフェクトし、G4

18で10日間選択した後の細胞をウエスタンブロッティングで発現確認した。コントロールのMDCK細胞と比較してみると、分子量マーカーの66KDaと42KDaの間にコントロールには見られないバンドがあった。ERIC-53は、その名の通り分子量は53KDaであり、このバンドの位置とほぼ一致していた。ゆえに、ERICランダムライブラリーがMDCK細胞に発現していることが確認された。

〔実施例9〕 間接蛍光抗体法を用いた発現確認

上記実施例8において、MDCK細胞にERICランダムライブラリーをトランスフェクションし、G418での選択を10日間行った細胞が、ERICランダムライブラリーを発現していることはウエスタンブロッティングによって確認された。つぎに、間接蛍光抗体法を用いた観察により、トランスフェクションした細胞のうち何%の細胞がERICランダムライブラリーを過剰発現しているかを確認した。間接蛍光抗体法とは非標識抗体を抗原と反応させ、ついで蛍光標識した2次抗体を1次抗体に結合させ抗原を追跡する方法である。1次抗体は2次抗体の抗原として働き、2次抗体として蛍光標識免疫グロブリン抗体が用いられることにより、組織や細胞の抗原物質の存在又は分布の分析を感度良くおこなうことができる。ライブラリーを構成するERICにはFLAGタグがついているので、1次抗体として抗FLAG抗体(m2Ab、IBI)を、2次抗体としてヤギ抗マウスIgG₁-FITCコンジュゲート(Molecular Probe社)を用い、蛍光顕微鏡で観察を行った。なお、ネガティブコントロールには何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を、ポジティブコントロールにはVIP36-FLAG clone 8(FLAGタグ付のVIP36が恒常的に発現している事が確認されている細胞株)を使用した。

25 6ウェルプレート(FALCON、3046)に高圧加熱滅菌済のカバーガラス(MATSUNAMI)をしき、その上に実施例7においてG418での10日間の選択後の細胞の一部(2×10^5 個)をまき、ウェルが細胞で90%ほど覆われるまで37℃、5%CO₂で培養した。また、コントロールに使用するMDCK細胞、VIP36-FLAG clone 8も同様に培養した。

サンプル作製当日、カバーガラスがある程度細胞で覆われていることを確認した。培地を捨て、PBSで一回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド/PBSを1ml添加し、室温で60分間処理をして細胞を固定した。その後、1回PBSで洗浄した。

- 5 0.1% Triton X-100/PBS (1ml) で室温で30分間処理して細胞膜を壊した。その後、PBSで5分間×3回洗浄した。

ブロッキング溶液 (1ml) を用いて室温で15分間ブロッキングした。その後、PBSで5分間×3回洗浄した。

- 10 2 μ g/ml の濃度にブロッキング溶液を用いて希釈した抗FLAG抗体 (m2Ab, IBI) を200 μ l カバーガラス上に添加して、室温で60分間反応させた後、PBSで10分間×3回洗浄した。

ブロッキング溶液 (1ml) を用いて室温で15分間再度ブロッキングした。その後、PBSで5分間×3回洗浄した。

- 15 2 μ g/ml の濃度にブロッキング溶液を用いて希釈した抗マウスIgG₁-FITC (CBL1000F) を200 μ l カバーガラス上に添加して、遮光し、室温で60分間反応させた後、PBSで10分間×3回洗浄した。

- 20 DAPI (Molecular Probes) 3 μ l と slow fade (Molecular Probes) 溶液A 3 μ l をスライドグラス (MATSUMI) にたらした。その上にカバーガラスを細胞が接着している面が下になるように置き、マニキュアで封入してサンプルとした。サンプルは遮光し、4℃で保管した。

- 25 作製したサンプルを蛍光顕微鏡 (OLYMPUS, BX52) で観察した。まず、ネガティブコントロールのMDCK細胞を、次にポジティブコントロールのVIP36-FLAG clone 8を観察し、抗体反応がうまくいっているかどうかを確認した。次に、MDCK細胞にERICランダムライブラリーをトランスフェクトして発現させた細胞の観察を行った。具体的には、サンプルの左右両側から無作為に数箇所を選択して撮影し、その写真に写っている全細胞数及びFITC陽性細胞数を計数し、何個に発現が見られるかを数値化した。

蛍光顕微鏡用サンプルの写真の結果として図9A~Cに示す。図9A~Cは、細胞の位相差像 (グレー) とFITCで染色した像 (緑色) を重ね合わせたもの

である。ネガティブコントロールのMDCK細胞の写真を図9Aに、ポジティブコントロールのVIP36-FLAG clone 8の写真を図9Bに示す。ポジティブコントロールは、各細胞が非常に強い緑色を発している、つまり2次抗体であるFITCで染まっているのが見て取れる。

- 5 MDCK細胞にERGICランダムライブラリーをトランスフェクトし、1.5 mg/mlのG418で10日間選択を行った後の細胞の観察を行ったものを図9Cに示す。これは、1枚の写真あたり1個若しくは2個の細胞が非常に強い緑色を発している、つまり2次抗体であるFITCに強く染まっている。撮影した8枚の写真に写っている細胞の数の総計は387個であり、そのうちFITC
- 10 に強く染まっている細胞は12個であった。つまり、今回観察したサンプルのうち、12個/387個、3.1%が発現している細胞であると言える。

〔実施例10〕植物レクチンの糖結合特異性に基づいたMACSによるERGICランダムライブラリー発現細胞の選別、及びFACSによる解析

- 15 本実施例においては、植物レクチンの糖結合特異性に着目し、MACSによるERGICランダムライブラリー発現細胞の選別を行った。具体的には、ERGICランダムライブラリー発現細胞を、ビオチン標識してあるマメ科レクチン数種類で1次標識した後、ストレプトアビジンマイクロビーズを用いて磁気標識し、磁気細胞分離システム(Magnetic Cell Sorting and Separation of Biomolecules、
- 20 以下MACSと略す)で選別した。その後、FACSで選別後の細胞の解析を行った。

(1) ERGICランダムライブラリー発現細胞のMACSによる選別

- ビオチン標識レクチンとして、Biotin-Lectin set I、II (ホーネンコーポレーション)を使用した。ConA、BPA、ABA、WGA、
- 25 SBA、SSA、DBA、DSA、RCA120、LCA、PNA、PHA-L₄、PHA-E₄、Lotus、UEA-I、及びMAMをそれぞれ1 mg/mlのものをPBSで希釈し、10 µg/mlに調整し、0.45 µmのフィルター(MILLEXOR-HV)を用いて滅菌した。

MACSによる選別を行う2日前に、10 cmディッシュ16枚に細胞を4×

10⁵個まき、37℃、5%CO₂で培養した。

当日、細胞をPBSで2回洗浄し、PBS-0.5mM EDTAを5ml添加し、37℃、5%CO₂で培養することにより細胞をはがした。190×gで5分間遠心し、上清を捨てた。

5 細胞に各レクチン(10μg/ml、2ml)を加え、氷上で30分間反応させた後、30×gで10分間遠心し、上清を取り除いた。300μlのラベリングバッファー(PBS, pH7.2、2mM EDTAをMiller-Qで調製し、フィルター滅菌したもの)で洗浄後、300×gで10分間遠心し、上清を取り除いた。

10 細胞を90μlのラベリングバッファーで懸濁し、そこにストレプトアビジンマイクロビーズ(Miltenyi Biotec GmbH)を10μl加え、6~12℃で15分間反応させた。500μlの分離バッファー(PBS pH7.2、2mM EDTA、0.5%BSAをMiller-Q水で調整し、フィルター滅菌したもの)で洗浄、300×gで10分間遠心し、上清を取り除いた後、500μlの分離バッファーで懸濁した。

MiniMACS(Miltenyi Biotec GmbH)の磁石にMS分離カラム(Miltenyi Biotec GmbH)をセットし、500μlの分離バッファーを流した。その後、上記細胞懸濁液をMS分離カラムにかけ、カラムから流出してきた細胞を陰性細胞(素通り)として回収した。500μlの分離バッファーを3回MS分離カラムにかけ、ここで流出してきた細胞も陰性細胞(素通り)として回収した。

カラムを磁石から外し、分離バッファー1mlをカラムに載せ、注射器のプランジャーで押し出すことにより流出してきた細胞を陽性細胞として回収した。

得られた陽性細胞と陰性細胞(素通り)を300×gで10分間遠心した後、上清を取り除いた。適当量の培地(1.0mg/ml G418添加済)にペレットを懸濁し、適当なサイズのプレート(6cmディッシュ若しくは10cmディッシュ)にまき、再培養した。

本実験は、レクチンの持つ糖結合特異性を利用して、細胞表面の膜タンパク質に付加している糖鎖の種類によって細胞を選別する、という意図で行ったものである。ビオチン標識レクチンで標識しMACSにかけた細胞は、全て陰性細胞(素

通り)と陽性細胞に分けられた。MACSを行った直後の細胞は、かなりのダメージを受けていると考え、MACSによる選別の翌日に細胞数を数え、どのような比率で分けられたかを確認した。その結果を下記表4に示す。ただし、ビオチン標識RCA120を1次標識として用いてMACSにかけた細胞は、陰性細胞

5 (素通り)・陽性細胞ともに全て死滅した。

表4

レクチン名	陰性(素通り)	陽性
ConA	80%	20%
DBA	88%	12%
LCA	90%	10%
PHA-E ₄	85%	15%
PNA	95%	5%
UEA-I	80%	20%
WGA	86%	14%
ABA	75%	25%
DSA	70%	30%
Lotus	93%	7%
MAM	20%	80%
PHA-L ₄	82%	18%
SBA	85%	15%
SSA	60%	40%
BPA	90%	10%

上記表4からも分かるとおり、本実施例においてMACSで選別した細胞のほとんどは素通りに回収され、用いたレクチンによる差異はあまり見られなかった。

今回得た細胞画分のうち、陰性細胞(素通り)を－(マイナス)、陽性細胞識したのちMACSで選別し、素通りに出てきた細胞はConA(－)、最終的に陽性細胞として回収した細胞をConA(＋)と名づけ、他のレクチンに関しても同様に標記する。これらの計30種類の細胞に対し、下記の実験でFACSによる解析を行うこととした。

(2) FACSによる解析

上記(1)でMACSによる選別を行い、その後順調に増殖した30種類の細胞に対して、FACSによる解析を行った。具体的には、1次抗体としてビオチン化レクチン15種類、2次抗体にはFITC標識されたストレプトアビジン(PIERCE)を反応させて、FACSを用いて蛍光強度の変化をみた。なお、コントロールとして何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。

FACSを行う前日に、解析したい細胞を6cmに 2×10^5 個まいた。当日に各々の細胞をPBSで2回洗浄した後、PBS-0.5mM EDTAを2.5ml加え、37℃、5%CO₂で培養することにより細胞をはがした。細胞がはがれたら、FACSバッファー(HBSS(日水製薬株式会社)9.8gをMilliQに溶かし、NaHCO₃0.35g、10%NaN₃10ml、20%BSA/NaN₃溶液5mlを加えて1Lに調整したもの)を2.5ml加え、15mlチューブに移し、1000rpmで10分間遠心した後上清を捨てた。さらにFACSバッファー5mlで細胞を一回洗浄し、細胞数を測定した後、190×gで10分間遠心し、上清を捨てた。

細胞が 8×10^6 個/ml(4×10^5 個/50μl)になるようにFACSバッファーで希釈し、希釈液を50μlずつ96ウェルU底プレート(3077、FALCON)に移した。各ウェルに1次抗体として、10μg/mlのビオチン標識レクチンを50μlずつ加え、穏やかに混ぜた後、氷上で30分間反応させた。

100μlのFACSバッファーを加え、580×gで3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらに2回繰り返した(なお、FACSバッファーは200μlずつ加えて洗浄した)。

2次抗体として、ストレプトアビジンFITC(20μg/mlになるようにFACSバッファーで希釈した)を50μl加え、軽く混ぜ遮光して氷上で20～30分間反応させた。

150μlのFACSバッファーを加え、580×gで3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらにもう1回繰り返した。

ウエルに200 μ lのFACSバッファを加え、ピペティングをしてFACSチューブへ移した。3 μ g/mlのヨードプロピジウム (SIGMA) を100 μ l加え、死細胞を染色した。細胞は、FACS caliberを用いたCell Quest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) により解析した。前方散乱光、側方散乱光、ヨードプロピジウム (SIGMA) の染色により生細胞を選別し、10000個の生細胞の情報を収集、解析した。

ERGICランダムライブラリーは、ERGIC-53の推定糖鎖認識決定部位にあたるアミノ酸にランダム変異を導入してある。ERGIC-53は小胞体(ER)とシスゴルジの間を行き来する輸送小胞に存在し、糖タンパク質の選別輸送(糖鎖認識部位がもつ糖結合特異性のため、 Ca^{2+} 依存的にマンノースと結合する)を行っている分子である。つまり、糖鎖認識部位又は糖鎖認識決定部位にランダム変異導入することにより、ERGICランダムライブラリーにはERGIC-53が本来持っているものとは異なる糖結合特異性が生じ、様々な糖鎖を持った糖タンパク質と結合するようになるので、細胞膜表面上に運ばれてくる糖タンパク質の糖鎖の種類にも多様性が生じると思われる。実施例10で行ったMACSでは、用いた各種ビオチン標識レクチンの糖結合特異性(下記表5参照)に基づいて細胞を分取し、それぞれの画分に回収した。一般にレクチンが糖鎖に結合する際、三糖前後の大きさを認識し、その立体構造を識別している。FACSを用いた解析では、ビオチン標識レクチンで染めることにより、どのような種類の糖鎖が、どのような割合で細胞表面に存在するかがわかることになる。

表5

レクチン名	由来	特異性
ConA	タチナタマメ	α -D-Man α -D-Glc
DBA	ドリコスマメ	D-GalNAc
LCA	レンズマメ	α -D-Glc α -D-Man
PHA-E ₄	インゲンマメ	D-GalNAc
PNA	ピーナッツ	D-Gal Gal β 1-3GalNAc
UEA-I	ハリエニシダ	α -L-Fuc
WGA	小麦胚芽	D-GlcNAc
ABA	マッシュルーム	β -D-Gal
DSA	洋種チョウセンアサガオ	β -D-GlcNAc Gal β 1-4GalNAc
Lotus	ミヤコグサ	α -L-Fuc
MAM	イヌエンジュ	SA α 2-3Gal
PHA-L ₄	インゲンマメ	D-GalNAc
SBA	ダイズ	D-GalNAc
SSA	ニホンニワトコ	SA α 2-6Gal/GalNAc
BPA	モクワンジュ	D-GalNAc > D-Gal

FACS解析の結果を図10に示す。図10では、MACSでの選別後の細胞とコントロール（野生型MDCK細胞）を比較して、平均蛍光強度にどれほどの差が生じるかを見た。図10において、黒線はコントロールのMDCK細胞、赤線はMACS後の（-）画分、緑線は（+）画分を示す。（+）及び（-）の平均蛍光強度がコントロールよりも高くなっていたものは、PNA及びABAで1次標識した後MACSで選別して得られた細胞のみであった。つまり、ERGICランダムライブラリー発現細胞のなかで、PNAレクチンに特異的に結合する糖鎖を細胞表面に提示している細胞がMACSで選別されたといえる。

SBA、DBA、PHA-E₄、PHA-L₄及びBPAはいずれもD-GalNAcに対して特異的に結合するレクチンである。図10のFACSの結果を見ると、どのレクチンの場合でも、コントロールと（+）（-）の平均蛍光強度差は殆ど見られなかった。

〔実施例 11〕 PNAレクチンに特異的な細胞の解析

本実施例においては、実施例 10 で得られた PNA (+) の細胞をさらに MACS で選別することにより、PNAレクチンに特異的に結合する糖鎖をより多く細胞表面に提示している細胞の分離・取得を試みた。また、FACS 及びウエスタンブロッティング法を用いたレクチン染色による解析を行った。

(1) PNA (+) の MACS による分離及び FACS による解析

実施例 10 で得た、PNA (+) の細胞に関して、さらに MACS で選別し、FACS で解析を行った。なお、FACS の際のコントロールとして、何もトランスフェクトしていない MDCK 細胞を用いた。

10 (1-1) MACS による PNA (+) の選別

10 cm ディッシュ (FALCON、3003) に細胞 (PNA (+)) を 4×10^5 個まき、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で 2 日間培養した。

細胞を PBS で 2 回洗浄し、PBS-0.5 mM EDTA を 5 ml 添加することにより、細胞をはがした。 $190 \times g$ で 5 分間遠心し、上清を捨てた。

15 細胞にビオチン標識 PNAレクチン ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、2 ml) を加え、氷上で 30 分間反応させた後、 $300 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を取り除いた。 $300 \mu\text{l}$ のラベリングバッファーで洗浄後、 $300 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を取り除いた。20 細胞を $90 \mu\text{l}$ のラベリングバッファーで懸濁し、そこにストレプトアビジンマイクロビーズ (Miltenyi Biotec GmbH) を $10 \mu\text{l}$ 加え、 $6 \sim 12^{\circ}\text{C}$ で 15 分間反応させた。 $500 \mu\text{l}$ の分離バッファーで洗浄、 $300 \times g$ で 10 分間遠心し、上清を取り除いた後、 $500 \mu\text{l}$ の分離バッファーで懸濁した。25 MiniMACS (Miltenyi Biotec GmbH) の磁石に MS 分離カラム (Miltenyi Biotec GmbH) をセットし、 $500 \mu\text{l}$ の分離バッファーを流した。その後、上記細胞懸濁液を MS 分離カラムにかけ、カラムから流出してきた細胞を陰性細胞 (素通り) として回収した。 $500 \mu\text{l}$ の分離バッファーを 3 回 MS 分離カラムにかけ、ここで流出してきた細胞も陰性細胞 (素通り) として回収した。

カラムを磁石から外し、分離バッファー 1 ml をカラムに載せ、注射器のプランジャーで押し出すことにより流出してきた細胞を陽性細胞として回収した。

得られた陽性細胞と陰性細胞（素通り）を $300 \times g$ で10分間遠心した後上清を取り除いた。適当量の培地（ 1.0 mg/ml G418添加済）にペレットを懸濁し、適当なサイズのプレート（6 cmディッシュ若しくは10 cmディッシュ）にまき、再培養した。

- 5 その結果、陰性細胞（素通り）に65%、陽性細胞に35%の細胞が回収された。以降PNA（+）をMACSにかけて回収した陰性細胞をPNA2（-）、陽性細胞をPNA2（+）と呼ぶこととした。1回目のMACS（実施例10）時には、PNA（-）が95%、PNA（+）が5%の割合で分かれたが、2回目には（+）の画分として回収された細胞の比率が高くなっていた。

10

（1-2）FACSによる解析

- FACSを行う前日に、解析対象の細胞を6 cmディッシュ（FALCON、3002）に 2×10^5 個まいた。当日に各々の細胞をPBSで2回洗浄した後、PBS-0.5 mM EDTAを5 ml加え、 37°C 、5% CO_2 で培養することにより細胞をはがした。細胞がはがれたら、FACSバッファを5 ml加え、15 mlチューブに移し、 $190 \times g$ で10分間遠心した後上清を捨てた。さらにFACSバッファ5 mlで細胞を一回洗浄し、細胞数を測定した後、 $190 \times g$ で10分間遠心し、上清を捨てた。
- 15

- 細胞が 8×10^6 個/ml（ 4×10^5 個/ $50 \mu\text{l}$ ）になるようにFACSバッファで希釈し、希釈液を $50 \mu\text{l}$ ずつ96ウエルU底プレート（3077、FALCON）に移した。各ウエルに1次抗体として、 $10 \mu\text{g/ml}$ のピオチン標識PNAレクチンを $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、穏やかに混ぜた後、氷上で30分間反応させた。
- 20

- $100 \mu\text{l}$ のFACSバッファを加え、 $580 \times g$ で3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらに2回繰り返した。
- 25

2次抗体として、ストレプトアビジンFITC（ $20 \mu\text{g/ml}$ になるようFACSバッファで希釈した）を $50 \mu\text{l}$ 加え、軽く混ぜ遮光して氷上で20～30分間反応させた。

150 μ l のFACSバッファーを加え、580 \times gで3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらにもう1回繰り返した（なお、FACSバッファーは200 μ l ずつ加えて洗浄した）。

- 5 ウェルに200 μ l のFACSバッファーを加え、ピペッティングをしてFACSチューブへ移した。3 μ g/ml のヨードプロピジウム（SIGMA）を100 μ l 加え、死細胞を染色した。細胞は、FACS caliber を用いたCell Quest（Becton-Dickinson Immunocytometry Systems）により解析した。前方散乱光、側方散乱光、ヨードプロピジウム（SIGMA）の染色により生細胞を選別し、10000個の生細胞の情報を収集、解析した。

- その結果を図11に示す。PNA（-）、PNA（+）、PNA2（+）の比較を行った。コントロールとして何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。図11から、PNA2（+）の平均蛍光強度はPNA（+）よりも高くなっており、PNAに特異的に結合する糖鎖を細胞表面により多く提示している細胞がPNA2（+）には回収されたことが示唆される。

（2）ウエスタンブロッティング法を用いたレクチン染色

- 上記（1）の結果より、PNA2（+）はPNA（+）やPNA（-）よりPNAレクチンに特異的に結合する糖鎖をより多く細胞表面に提示している細胞群であると考えられた。そこで、本実施例では、ウエスタンブロッティング法を用い、PNAレクチンによるレクチン染色を行い、PNA（-）、PNA（+）、PNA2（+）の染色度合の差を見た。また、ConA、MAM、PHA-E₄及びPHA-L₄の4種類を用いて、PNAとは糖結合特異性が異なるレクチンでもウエスタンブロッティング法を用いたレクチン染色を行い、比較を行った。
- 25 なお、コントロールとして何もトランスフェクトしていないMDCK細胞を用いた。

6ウェルプレート（FALCON、3046）に細胞をまき、ウェルが細胞で90%程度埋め尽されるまで、37℃、5%CO₂で培養した。

細胞が十分増殖したら、細胞溶解バッファー（10mM EDTA、0.2%T

riton X-100、1mM PMSF、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチンをPBSで調整したもの)を $500\mu\text{l}$ 加え、氷上に1~1.5時間置くことにより細胞を溶解させた。

- BCAタンパク質アッセイキット(PIERCE)を使用して溶解バッファーで処理後の細胞溶解液のタンパク質定量を行った。濃度が最も低かった溶液に合わせて細胞溶解液をPBSを用いて希釈した。タンパク質濃度をそろえた各細胞溶解液から $10\mu\text{l}$ を1.5mlチューブに移し、 $2\mu\text{l}$ の6×SDS可溶化バッファー(還元)を加え、 100°C で5分間熱処理した。その後、12.5%アクリルアミドゲルを使用して200Vで45分間電気泳動した。
- 10 ウェスタンブロッティング法を用いて、上記電気泳動したタンパク質をPVD F膜(Immobilon™ Transfer Membranes, Millipore)へ100Vで60分間転写した。転写後、マーカー部分を切り取り、CBBで染色、脱染色を行った。残りの膜はブロッキング溶液に浸して 4°C で一晩放置した(膜が抗体溶液に均一にブロッキング溶液に浸るように、振とうした)。
- 15 ブロッキング後の膜をハイブリバッグソフト(コスモバイオ)に入れ、抗体と反応させた。1次抗体としては、ビオチン標識レクチンを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度にブロッキング溶液で希釈した溶液(4.5ml)を用い、室温で2時間反応させた。その後、洗浄バッファーで5分間×3回洗浄し、2次抗体と反応させた。2次抗体にはstreptavidinアルカリホスファターゼを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に
- 20 ブロッキング溶液で希釈した溶液(4.5ml)を用い、室温で30分間反応させた。その後、洗浄バッファーで15分間、5分間×2回の計3回洗浄した。洗浄後、膜を発色基質溶液に浸し、膜にバンドが見えるまで放置した。発色をとめたいところで水道水で膜を洗い、風乾した。

- 結果を図12に示す。PNAを用いたウェスタンブロッティングでは、PNA 2(+)>PNA(+)>PNA(-)>コントロールの順番でバンドの濃さが濃くなっていたように見えたが、顕著な差は見られず、PNAへの特異性が今回解析した細胞画分すべてで同程度であることが示唆された。また、ConA、PHA-E₄、PHA-L₄を用いたウェスタンブロッティングの結果では、コントロールとPNA(-)、PNA(+)、PNA 2(+))の染まり方に大きな差は

見られなかった。MAMを用いたウエスタンブロッティングの結果では、わずかながらコントロール>PNA (-)>PNA (+)>PNA 2 (+)の順番でバンドが濃くなっているように見えた。

次に、各レクチンによる染色度合を比較してみた場合、コントロール、PNA (-)、PNA (+)、PNA 2 (+) いずれもConA>PHA-E₄、PHA-L₄>PNA>MAMという順番で濃く染まっていた。

ここで、本実験のウエスタンブロッティングに用いた各レクチンの糖結合特異性について説明する。ConAは、 α -D-Man及び α -D-Glcに対して親和性を示し、アスパラギン結合型糖鎖の2本鎖複合型、高マンノース型、混成型糖鎖と結合するレクチンである。また、PHA-L₄とPHA-E₄はいずれもD-GlcNAcに対して親和性を示し、アスパラギン結合型糖鎖のなかでも複合型糖鎖に結合する。PNAはD-Galに対して親和性を有し、特にGal β 1-3GalNAcに対して強く結合する、Ser/Thr型糖鎖に特異的なレクチンである。そして、MAMはSA α 2-3Galに特異性を持ち、結合にはSA α 2-3Gal β 1-3GalNAcに強く結合する、シアル酸特異的なレクチンである。糖鎖の生合成過程から見ると、高マンノース型糖鎖はシスゴルジで、複合型糖鎖はメディアルゴルジで、Ser/Thr型糖鎖はトランスゴルジで付加される。そして、シアル酸を持った糖鎖はトランスゴルジの中でもプロセシングの最終過程で付加される。以上のことと、本実験のウエスタンブロッティングでConA>PHA-E₄、PHA-L₄>PNA>MAMの順に濃いバンドが検出されたことには、相関関係があると考えられる。すなわち、糖鎖のプロセシングにおいて早い段階で付加される糖鎖に特異的なレクチンを用いたウエスタンブロッティングほど、よく染まっている、ということである。このことは、生合成途中の細胞内糖タンパク質が大部分を占め、細胞表面に発現された糖タンパク質の差異が相対的に小さかった可能性が考えられる。

(3) トランスゴルジにおける糖鎖付加について

上記(2)で行ったウエスタンブロッティングの結果、MAMとPNAを用いたウエスタンブロッティングではコントロール、PNA (-)、PNA (+)、

PNA 2 (+) の各サンプルのバンドの濃さ（染色度合）にはほんのわずかではあるが差異が見られるようであった。そこで本実施例では、ウエスタンブロッティングのバンドの濃さを定量化を行った。また、ウエスタンブロッティングでは細胞内外のタンパク質をまとめて溶解して解析するので、生合成過程の細胞内糖タンパク質が大部分を占め、PNAに対する結合特異性を持った膜糖タンパク質との差異をはっきりと見る事が出来ないと考え、フローサイトメトリーによる解析も行った。

(3-1) イメージアナライザーによる解析

上記(2)で得たウエスタンブロッティングの膜をイメージアナライザー (LAS-1000、富士フィルム) を用いて定量化し、バンドの濃さを比較した。

イメージアナライザーを用いての解析は、定量化対象のバンドの濃さの単位面積あたりの平均値を求め、比較した。その結果を下記表6に示す。

表6

	PNA	MAM
コントロール	4554000	4792000
PNA(-)	4618000	4776000
PNA(+)	4638000	4750000
PNA2(+)	4747000	4714000

上記表6に示すように、PNAを用いたウエスタンブロッティングではコントロール<PNA (-)<PNA (+)<PNA 2 (+)、MAMを用いたウエスタンブロッティングではコントロール>PNA (-)>PNA (+)>PNA 2 (+)の順でバンドが濃くなっていた。しかし、その差はそれぞれ1%程度であり、微妙な差でしかなかった。

(3-2) FACSによる解析

次に、FACSを用い、細胞表面の膜糖タンパク質に焦点をあてて解析を行った。FACSを行う前日に、解析対象の細胞(コントロールのMDCK細胞、PNA (-)、PNA (+)、PNA 2 (+))を6cmディッシュ(FALCO

N、3002)に 2×10^5 個まいた。当日に各々の細胞をPBSで2回洗浄した後、PBS-0.5mM EDTAを5ml加え、37℃、5%CO₂で培養することにより細胞をはがした。細胞がはがれたら、FACSバッファを5ml加え、15mlチューブに移し、 $190 \times g$ で10分間遠心した後上清を捨てた。

- 5 さらにFACSバッファ5mlで細胞を一回洗浄し、細胞数を測定した後、 $190 \times g$ で10分間遠心し、上清を捨てた。

細胞が 8×10^6 個/ml (4×10^5 個/ 50μ l)になるようにFACSバッファで希釈し、希釈液を 50μ lずつ96ウエルU底プレート(3077、FALCON)に移した。各ウエルに1次抗体として、 10μ g/mlのビオチン標識PNAレクチン若しくはMAMレクチンを 50μ lずつ加え、穏やかに混ぜた後、氷上で30分間反応させた。

100μ lのFACSバッファを加え、 $580 \times g$ で3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほぐした。同様の洗浄操作をさらに2回繰り返した。

- 15 2次抗体として、ストレプトアビジンFITC (20μ g/mlになるようFACSバッファで希釈した)を 50μ l加え、軽く混ぜ遮光して氷上で20～30分間反応させた。

150μ lのFACSバッファを加え、 $580 \times g$ で3分間遠心し、上清を捨てキムタオルに押し当て水分を除いた後、ペレットをボルテックスにかけてほ

- 20 ぐした。同様の洗浄操作をさらにもう1回繰り返した。

ウエルに 200μ lのFACSバッファを加え、ピペティングをしてFAC Cチューブへ移した。 3μ g/mlのヨードプロピジウム(SIGMA)を 100μ l加え、死細胞を染色した。細胞は、FACScaliburを用いたCell Quest (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems)により解析した。前方散乱光、側方散乱光、ヨードプロピジウム(SIGMA)の染色により

- 25 生細胞を選別し、20000個の生細胞の情報を収集、解析した。

1次抗体としてビオチン標識レクチン(MAM、PNA)、2次抗体としてストレプトアビジンFITCを用い、コントロールのMDCK野生型細胞、PNA(-)、PNA(+)、PNA2(+)の4つの細胞画分の蛍光強度を測定し、

- その平均値を比較した。その結果を図13に示す。図13において、PNAを1次抗体として用いたFACSの結果ではコントロール<PNA(-)<PNA(+)<PNA2(+)の順で平均蛍光強度が高くなっている。一方、MAMを1次抗体として用いたFACSの結果ではコントロール>PNA(-)>PNA(+)>PNA2(+)の順で平均蛍光強度が低くなっており、MAMとPNAを用いたFACSの結果が逆相関を示していた。また、ウエスタンブロッティングにおける染色度合をイメージアナライザーで解析した結果とも一致していた。ここで、糖鎖のプロセッシングという観点からこの結果を考察してみた場合、Ser/Thr結合型糖鎖には、まずGalNAc-Ser/Thr → Galβ1-3GalNAc-Ser/Thr → SAα2-3Galβ1-3GalNAc-Ser/Thrの順に糖鎖が付加されていく。PNAはGalβ1-3GalNAc-Ser/Thrを特異的に認識し結合するが、これにSA(シアル酸)が付加されると全く認識しない。一方、MAMはSAα2-3Galβ1-3GalNAc-Ser/Thrを特異的に認識し結合するレクチンであり、シアル酸が付加されていない段階の糖鎖は認識しない。以上のことと、図13に示した結果をあわせて考えると、PNA2(+)にはGalβ1-3GalNAc-Ser/Thrを細胞表面により多く提示している細胞画分が回収されていると考えられる。
- 20 以上の実施例5~11においては、ERGIC-53の推定糖鎖認識決定部位に相当する9アミノ酸(DTFDNDGKK)のうち7アミノ酸にランダム変異導入(DXXXNXXXX, Xは任意のアミノ酸を表す)し、ベクターであるpRc-CMV2に導入した、ERGIC-53ランダムライブラリーを作製し、MDCK細胞にトランスフェクトし、組換え体ERGIC-53を強制発現させた。これを本明細書中では「ERGICランダムライブラリー発現細胞」と称している。トランスフェクト後、G418によるセレクションを行い、細胞表面に多種多様な糖鎖を持った糖タンパク質を発現する細胞を選別するために、この細胞を各種ビオチン標識レクチンで1次標識し、その後ストレプトアビジン・マイクロビーズで磁気標識して、磁気細胞分離システム(MACS)を用いた選別を行った。その結果、

数種のレクチンと反応するMDCK細胞を分離することができ、特異的なレクチン結合活性を有する（すなわち特異的に糖鎖を認識する）細胞を得ることができた。

5 〔実施例12〕変異VIP36トランスフェクト細胞のFACSを用いた細胞選別、及び改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の濃縮

 (1) 改変VIP36発現CHO細胞ライブラリーの調製

10 10%ウシ胎児血清（FBS）を含むRPMI 1640で5%CO₂存在下にて、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞（東北大学細胞バンクから供与）を培養した。コンフルエントになるまで培養したCHO細胞をトリプシン/EDTAにより回収し、1/10に希釈して更に一晚培養した。2. 4×10⁶個の細胞に対して、実施例1において作製した改変VIP36遺伝子ライブラリーのプラスミド12μg（線状）を用い、リポフェクトアミン2000（GIBCO）を用いた常法に従ってCHO細胞にトランスフェクションを行った。48時間に
15 わたり10%FBSを含むRPMI 1640中、5%CO₂存在下で培養後、1. 2mg/ml G418（Calbiochem）を含む同培養液で10～14日間培養を行い、恒常的に改変VIP36を発現している細胞株のみを選別した。

 (2) フローサイトメトリーによる改変VIP36発現細胞のスクリーニング

20 上記(1)で調製を行った改変VIP36発現CHO細胞を10cmディッシュに10%コンフルエントになるように細胞を希釈し、培養を行った。48時間後、0.5mM EDTA、150mM NaClを含むリン酸緩衝液、pH7.4（EDTA/PBS）により細胞をはがし回収して0.5mlのFACS緩衝液に懸濁した。次に1次抗体としてビオチン化PNAレクチンを5μg/mlになるように加え、氷上30分間放置した。FACS緩衝液（Beckton Dickinson）で過剰なビオチン化PNAレクチンを洗浄後、2次抗体としてFITC標識ストレプトアビジンを10μg/mlの濃度になるように加え、同様に20分間氷上で反応させた。FACS緩衝液で洗浄し、さらにナイロンメッシュを通して凝集した細胞塊を除いた。10⁵個/mlの濃度になるように細胞をFACS緩衝液

に懸濁し、ソーティング時まで氷上で保存した。

細胞の選別は、実施例 3 記載の MACS を利用した方法に代えて、フローサイトメトリーを用いることにした (図 14)。フローサイトメトリーは Becton Dickinson 社製 FACS Vantage を用いて行った。光軸調製、
5 流路の無菌化の後、マニュアルに従って、上述の通り調製した細胞の分取を行った。PNA レクチン陽性細胞画分を約 0.1% 前後になるように選別のウインドウを設定した。1.4 × 10⁶ 個の細胞をソーティングし、1,187 個の PNA レクチン陽性細胞画分を得た。回収のチューブには、予め PNA のハプテン糖であるラクトースを 20 μM の濃度で FACS に加えておいた。陽性細胞を 24
10 ウェルディッシュにまき、10% FBS を含む RPMI 1640 で 5% CO₂ 存在下で培養を行った。ラクトースは、細胞に結合した PNA レクチンが細胞毒性を与える可能性があるため、PNA レクチン陽性細胞から遊離させるために使用した。2 週間後、PNA レクチンで細胞を染色し、PNA 陽性細胞の割合を調べた (図 15、1st PNA (+))。

15 2 回目のソーティングは PNA レクチン陽性細胞画分を約 0.25% 前後になるように選別のウインドウを設定し、1 回目と同様の方法により行った (2,352 個 / 6.3 × 10⁵ 個)。2 週間培養後、PNA レクチンで細胞を染色し、PNA 陽性細胞の割合を調べた (図 15、2nd PNA (+))。

20 (3) PNA レクチン陽性細胞のクローン化

2 回目のソーティングで回収した PNA レクチン陽性細胞を、10 ml の 10% FBS を含む RPMI 1640 で懸濁した。平底 96 ウェルプレートに 200 μl ずつ 50 ウェルにまき、培養を行った。ウェル内のコロニーが肉眼で確認
25 A / PBS で回収し、24 ウェルプレートに継代培養した。1 コロニー / ウェルとなったものは、50 ウェル中 19 ウェルであった。24 ウェルプレートでの培養がコンフルエントになった時点で、それぞれのクローン細胞の PNA レクチンとの結合性を調べた。19 ウェル中、13 ウェルの細胞が PNA で強く染色され、PNA レクチン陽性細胞クローンが複数得られた。その一つのクローン 23 につ

いて図15に示す(c l o n e 2 3)。図15はの上段は、分取(ソーティング)前、1回目のソーティング後、及び2回目のソーティング後の蛍光強度を示す。また図15の下段に、2回目のソーティング後に得られたクローン23の蛍光強度を示す。図15の右下に示すグラフより、F I T Cの蛍光強度は、親株のC H O細胞では3. 2であるのに対し、クローン23では約100倍の268. 5であることが示された。

(4) PNAレクチン陽性細胞クローン12のF L A Gタグ発現の検討

上記(3)で得られたクローンの一つ(クローン12)について、外来遺伝子産物である改変V I P 3 6が発現しているか否かを、抗F L A G抗体を用いて検討した。改変V I P 3 6遺伝子を作製する際に、そのN末端にF L A Gタグ配列を付加するように設計してあるため、改変V I P 3 6は抗F L A G抗体で染色することによりその発現を調べることができる。そこで、70%コンフルエントに培養したPNAレクチン陽性細胞クローン12をE D T A / P B Sで回収した後、抗F L A G抗体(3. 3 μ g / m l)及びビオチン化PNA(3. 3 μ g / m l)で同時に氷上にて30分間にわたり反応させた。F A C S緩衝液で洗浄後、さらにF I T C標識抗マウスI g G(5 μ g / m l)、P E(フィコエリスリン)標識ストレプトアビジン(1 μ g / m l)で氷上にて20分間反応させ、アナライザー(F A C S C a l i b u r)で細胞の染色強度を解析した(図16)。図16において、「なし」は一次抗体に相当するものをなにも加えていない場合を、「対照抗体」はC H O細胞に結合しないことがわかっている抗ラットI g G抗体を、「PNA」はビオチン化PNAレクチンを、「抗F L A G抗体」は抗F L A G抗体を、それぞれ一次抗体として反応させ細胞を染色した結果を表す。クローン12細胞は、発現量は少ないながら、明らかにF L A G陽性であった。

(5) クローン細胞に発現した改変V I P 3 6遺伝子解析

種々のPNAレクチン陽性細胞クローンからのmRNAの抽出は、 μ M A C Sシステム(第一化学薬品)を用いて行った。10cmディッシュ4枚に50~60%コンフルエントになるまで培養した細胞をトリプシン/E D T Aで回収し、

溶解／結合バッファー（第一化学薬品、キット内に添付されているもの）に懸濁させたのち細胞を破壊した。オリゴ（dT）マイクロビーズ（第一化学薬品）に mRNA をアニールさせ、MACS カラムにアプライした。カラムをさらに溶解／結合バッファー、洗浄バッファー（第一化学薬品、キット内に添付されているもの）で洗浄した後、溶出バッファー（第一化学薬品、キット内に添付されているもの）を加えて、カラムから mRNA を溶出させた。1. 1×10^7 個の細胞から、6.3 mg の mRNA を得た。

1 mg の mRNA を $20 \mu\text{l}$ の MilliQ 水に溶かし、オリゴ（dT） $1 \mu\text{g}$ 加え、 70°C にて 10 分間加熱後、氷上に戻した。 $10 \text{ mM dNTP } 2 \mu\text{l}$ 、 $0.1 \text{ M dTT } 4 \mu\text{l}$ 、 $40 \text{ U}/\mu\text{l RNase インヒビター } 2 \mu\text{l}$ 、 $5 \times$ フーストストランドバッファー $8 \mu\text{l}$ 加え、 42°C で暖めた後、Superscript II $2 \mu\text{l}$ 加え、 42°C にて 50 分間反応させた。この反応液を次の PCR 反応の鋳型に用いた。ライブラリー作製の際に用いた VIP36 遺伝子 5' 末端と 3' 末端のオリゴ DNA プライマー（実施例 1、VIPran1, 5）を使って、PCR 反応を行った。反応は KOD-plus DNA ポリメラーゼ（TOYOBO）を用い、変性 94°C にて 15 秒間、アニーリング 51°C にて 30 秒間、伸長 68°C にて 1 分間の条件で 35 サイクル行った。アガロース電気泳動により、約 960 塩基対に相当するバンドが確認され、このバンドの DNA を回収した。回収した遺伝子は pBluescript II SK の SmaI サイトに組み込み、大腸菌内で増幅後抽出して、その塩基配列を決定した。クローン 12 に導入されていた改変 VIP36 をコードする遺伝子を解析した結果、改変したループをコードする塩基配列が 5' GACCCTGATTCTAATGGTGGTTCTTTT 3'（配列番号 16）であり、予想されるアミノ酸配列は Asp-Pro-Asp-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Phe（配列番号 17）であった。

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、その全文を参考として本明細書中にとり入れるものとする。

本発明により、糖鎖改変方法及び改変型糖鎖を有するタンパク質を発現する細胞が提供される。特定の構造を有する糖鎖及びそのような糖鎖を有するタンパク質は、医薬分野において必要とされており、それらを簡便かつ迅速に製造できるため、本発明に係る糖鎖改変方法及び改変型糖鎖を有するタンパク質を発現する

5 細胞は有用である。

また、本発明により、多様な糖鎖を発現する細胞からなる糖鎖ライブラリーを作製することができ、未知の糖鎖を生成し、その有用性を検討することも可能となる。

10 配列フリーテキスト

配列番号 5 ～ 16 : 合成オリゴヌクレオチド (N=A, T, G又はC)

配列番号 17 : 合成ペプチド

請 求 の 範 囲

1. カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質の糖鎖を改変することを特徴とする、糖鎖結合タンパク質の糖鎖改変方法。
- 5 2. カーゴレセプターがVIP 3.6 及び／又はERGIC-53 である請求項1 記載の糖鎖改変方法。
3. 糖鎖結合タンパク質が膜結合タンパク質又は分泌タンパク質である請求項1 又は2 記載の糖鎖改変方法。
4. 請求項1～3 のいずれか1 項に記載の糖鎖改変方法により糖鎖が改変された
10 糖鎖結合タンパク質。
5. 請求項4 記載の糖鎖結合タンパク質から糖鎖を切断することを特徴とする、改変された糖鎖の製造方法。
6. 請求項5 記載の製造方法により製造される改変された糖鎖。
7. カーゴレセプターの糖鎖認識部位を改変することにより糖鎖結合タンパク質
15 の糖鎖を改変することを特徴とする、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞の作製方法。
8. カーゴレセプターがVIP 3.6 及び／又はERGIC-53 である請求項7 記載の作製方法。
9. 糖鎖結合タンパク質が膜結合タンパク質又は分泌タンパク質である請求項7
20 又は8 記載の作製方法。
10. 請求項7～9 のいずれか1 項に記載の作製方法により作製される、改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞。
11. 請求項10 記載の細胞を培養し、得られる培養物から改変型糖鎖結合タンパク質を採取することを特徴とする、改変型糖鎖結合タンパク質の製造方法。
- 25 12. カーゴレセプターの糖鎖認識部位にランダム突然変異を導入し、改変された糖鎖を有する糖鎖結合タンパク質を発現させることを特徴とする改変型糖鎖ライブラリーの作製方法。
13. 請求項10 記載の改変型糖鎖結合タンパク質を発現する細胞、又は請求項12 記載の作製方法により作製される改変型糖鎖ライブラリーを用いて、糖鎖

結合タンパク質又は糖鎖結合タンパク質から切り出した糖鎖、あるいは特定の糖鎖と相互作用する被験物質をスクリーニングする方法。

図 1

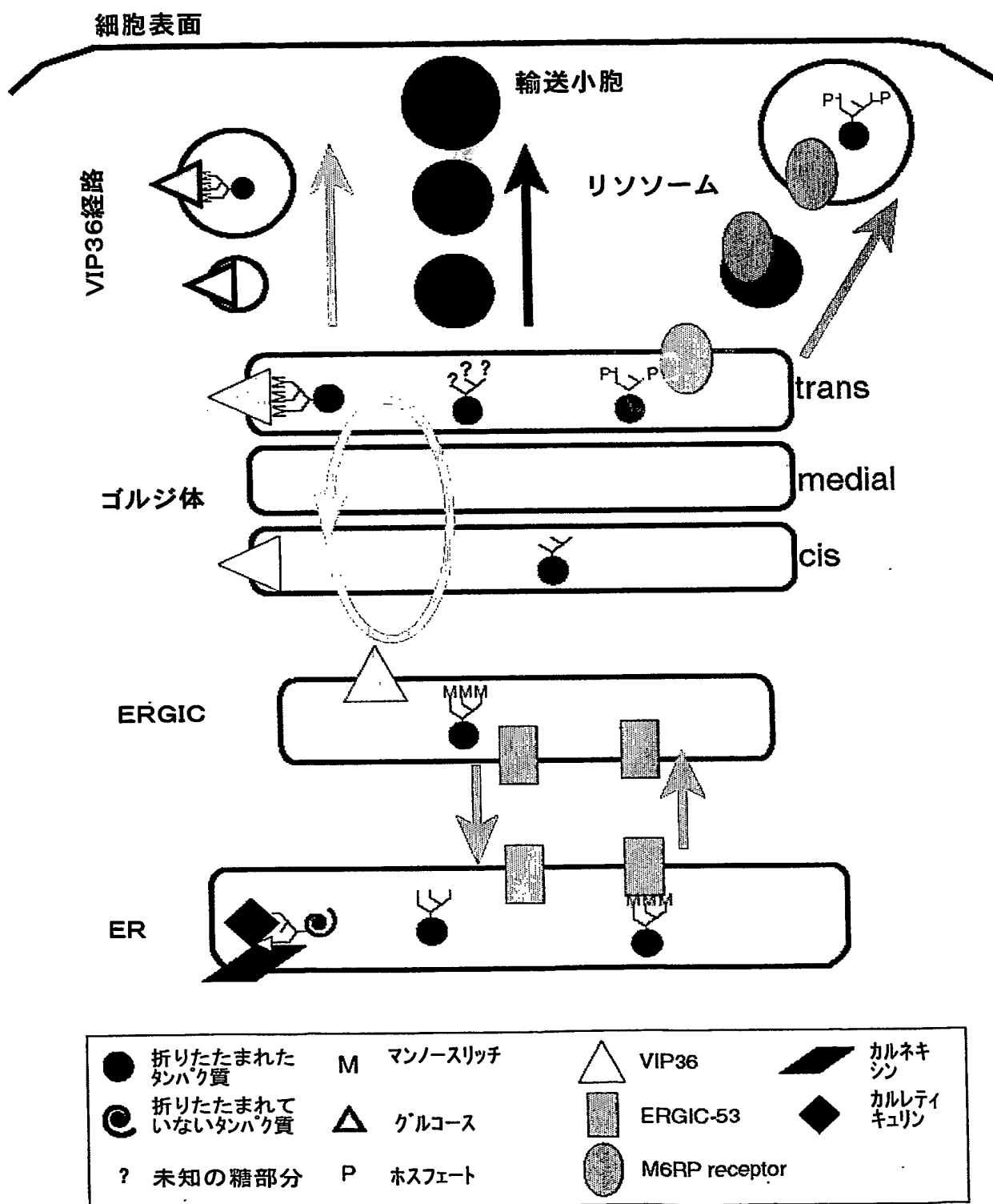


図 2

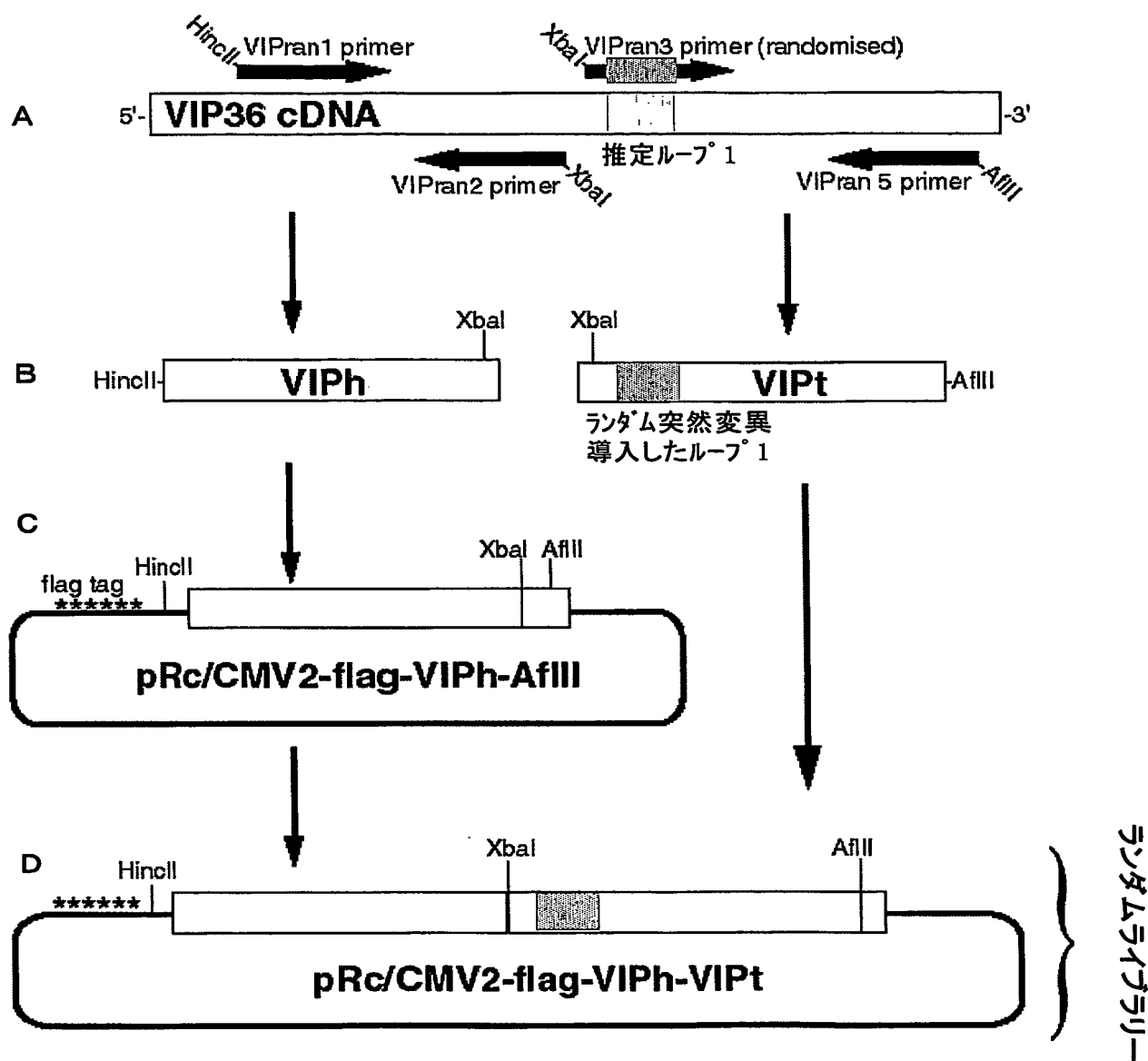


図 3

A

VIP36 original
vip3f clone
vip26f clone
vip28f clone
B8-VIP10.Seq clone
B2-VIP7.Seq clone
B6-VIP9.Seq clone
A3-VIP2.Seq clone

GAC	ACC	TAC	CCC	AAT	GAT	GAG	ACC	ACT
GAC	AGG	CAT	GGG	AAT	TAT	AGT	GTT	TAT
GAC	ATT	CGT	TTG	AAT	CTT	GAG	AGT	GGT
GAC	CGT	GCG	CTT	AAT	CTT	ATG	CTT	CGT
GAC	GTG	TTT	GCT	AAT	CAT	TGT	CAT	TTG
GAC	-TG	TGT	GGT	AAT	TGT	GGG	TGT	TAG
GAC	CAT	GGG	TTT	AAT	GCT	AAT	CGG	ATT
GAC	GTG	TGT	TGG	AAT	GGG	GGG	TGT	AAT

B

VIP36 original
vip3f clone
vip26f clone
vip28f clone
B8-VIP10.Seq clone
B2-VIP7.Seq clone
B6-VIP9.Seq clone
A3-VIP2.Seq clone

D	T	Y	P	N	D	E	T	T
D	R	H	G	N	Y	S	V	Y
D	I	R	L	N	L	E	S	G
D	R	A	L	N	L	M	L	R
D	T	Y	P	N	D	E	T	T
D	-	C	G	N	C	G	C	*
D	H	G	F	N	A	N	R	I
D	V	C	W	N	G	G	C	N

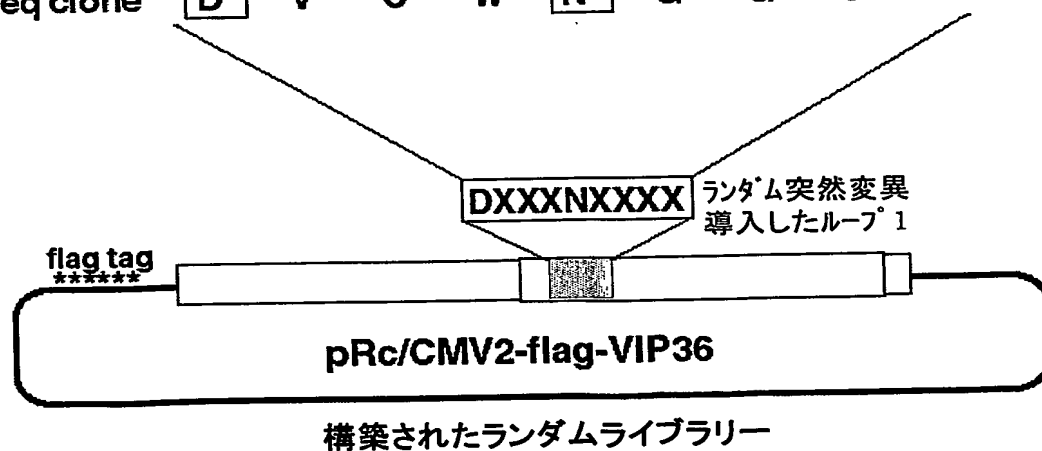


図 4

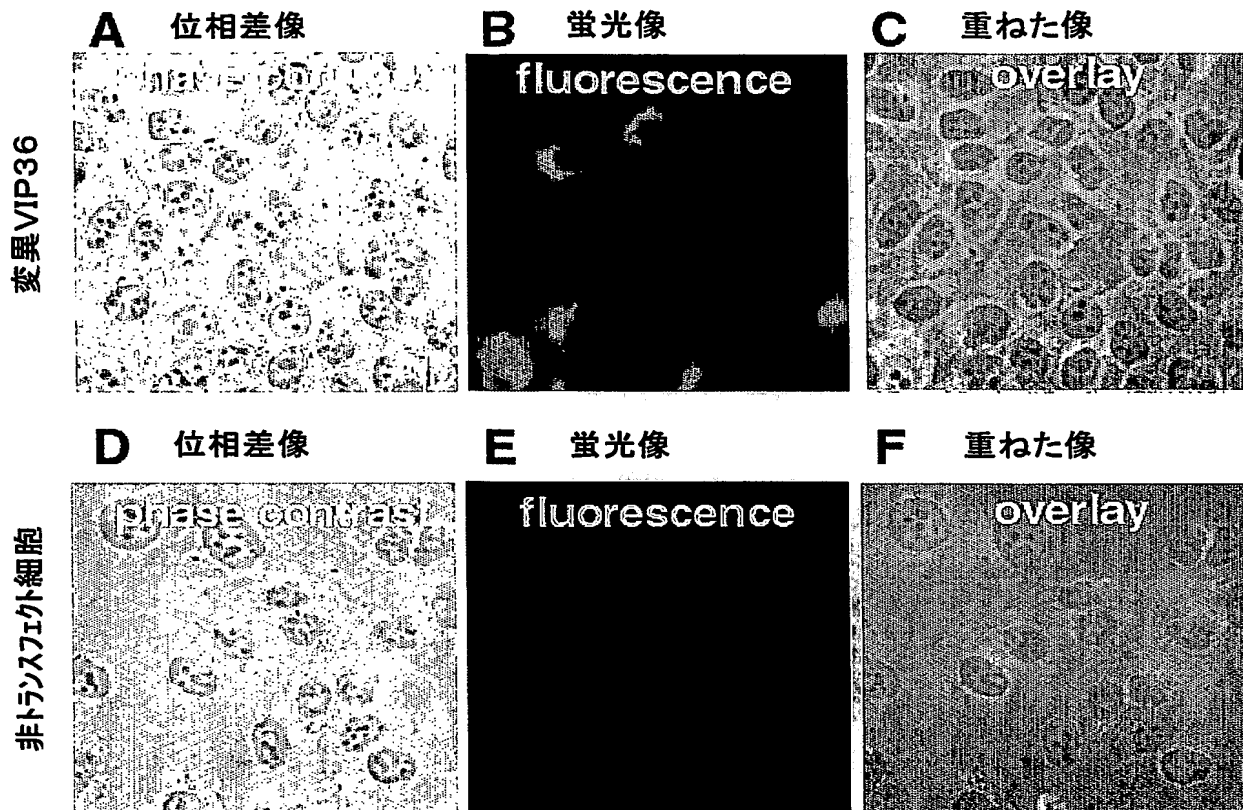


図5

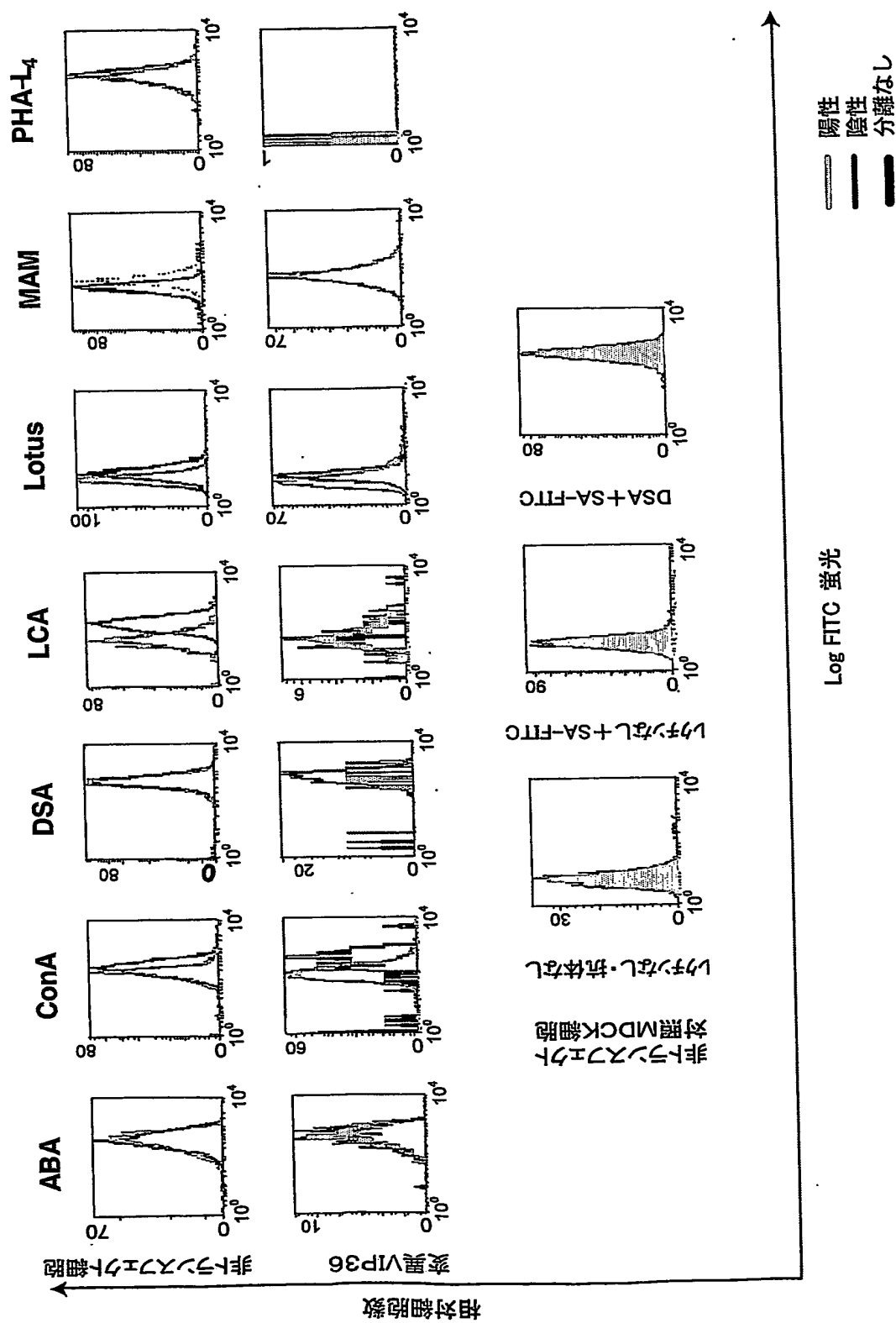


図 6

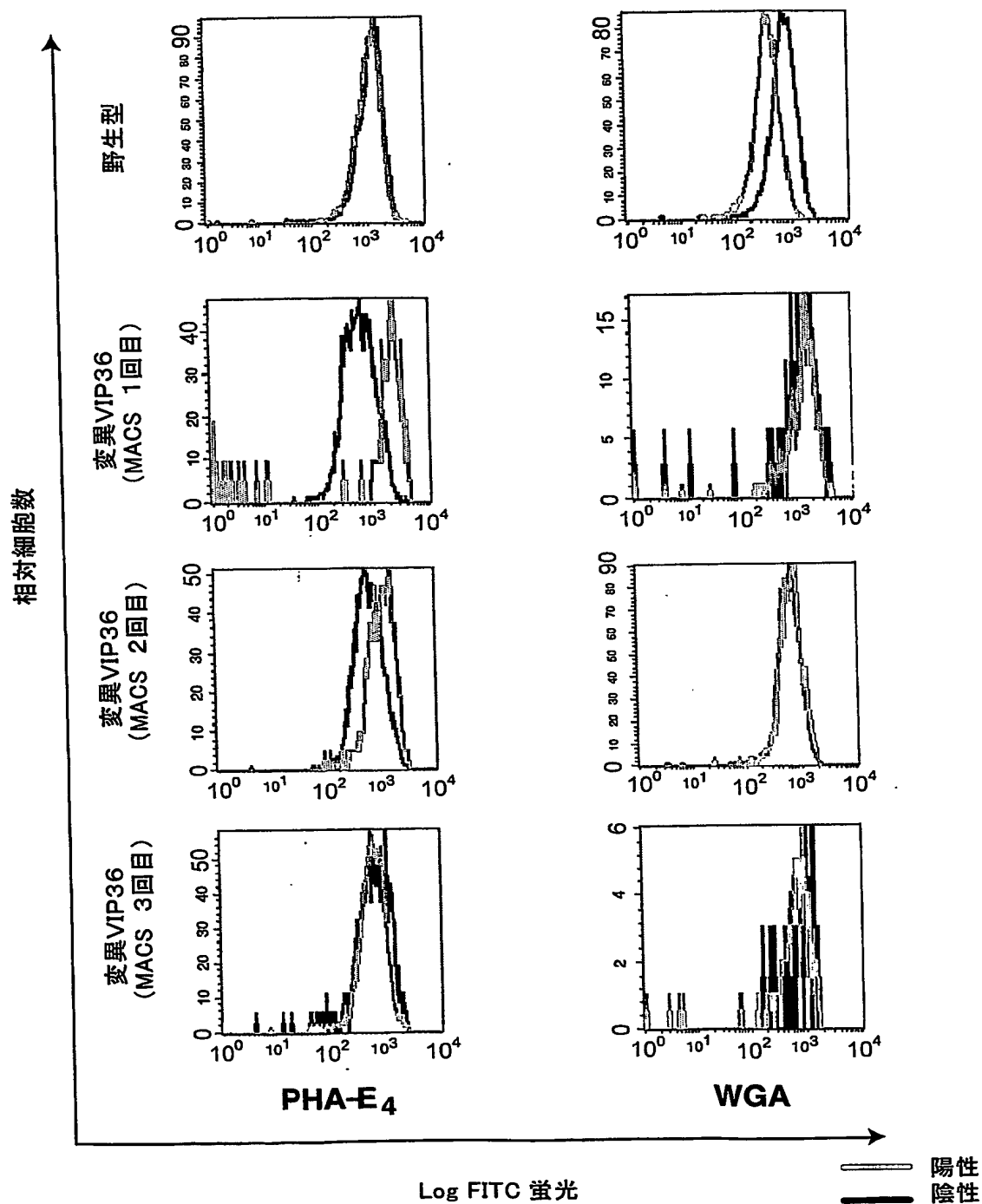


図 7

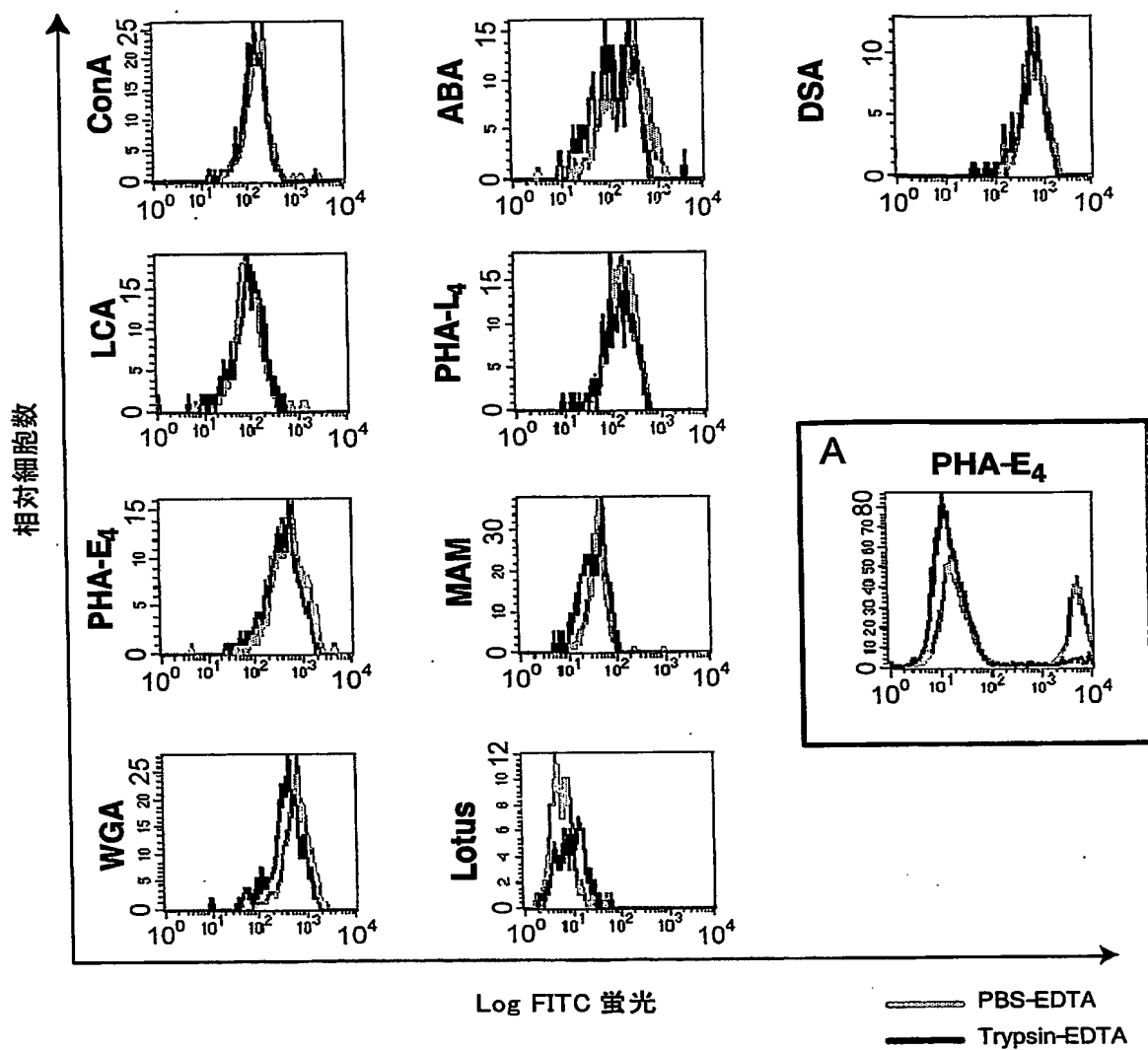


図 8

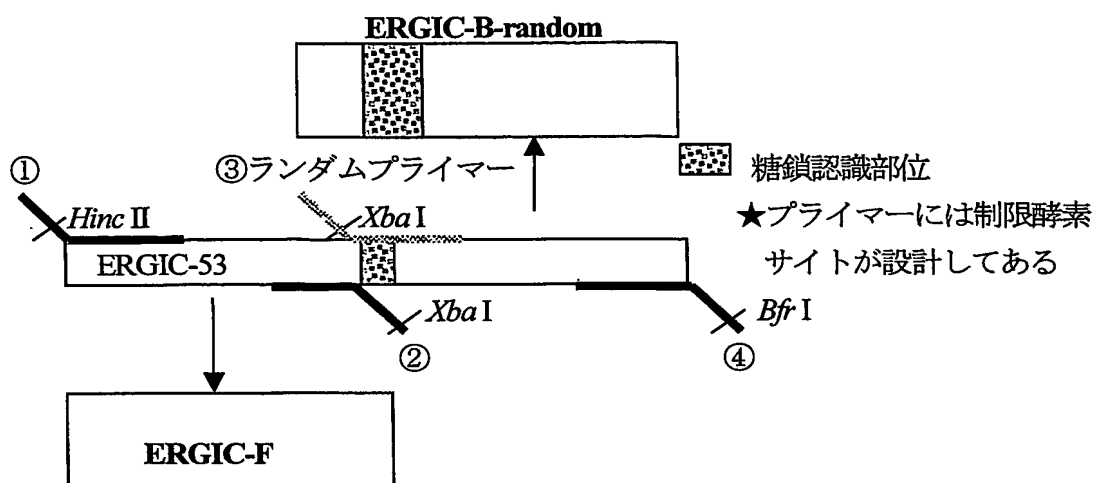


図 9 A

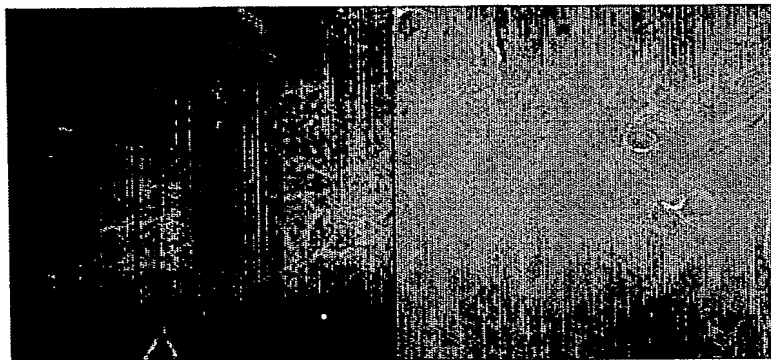


図 9 B



図 9 C

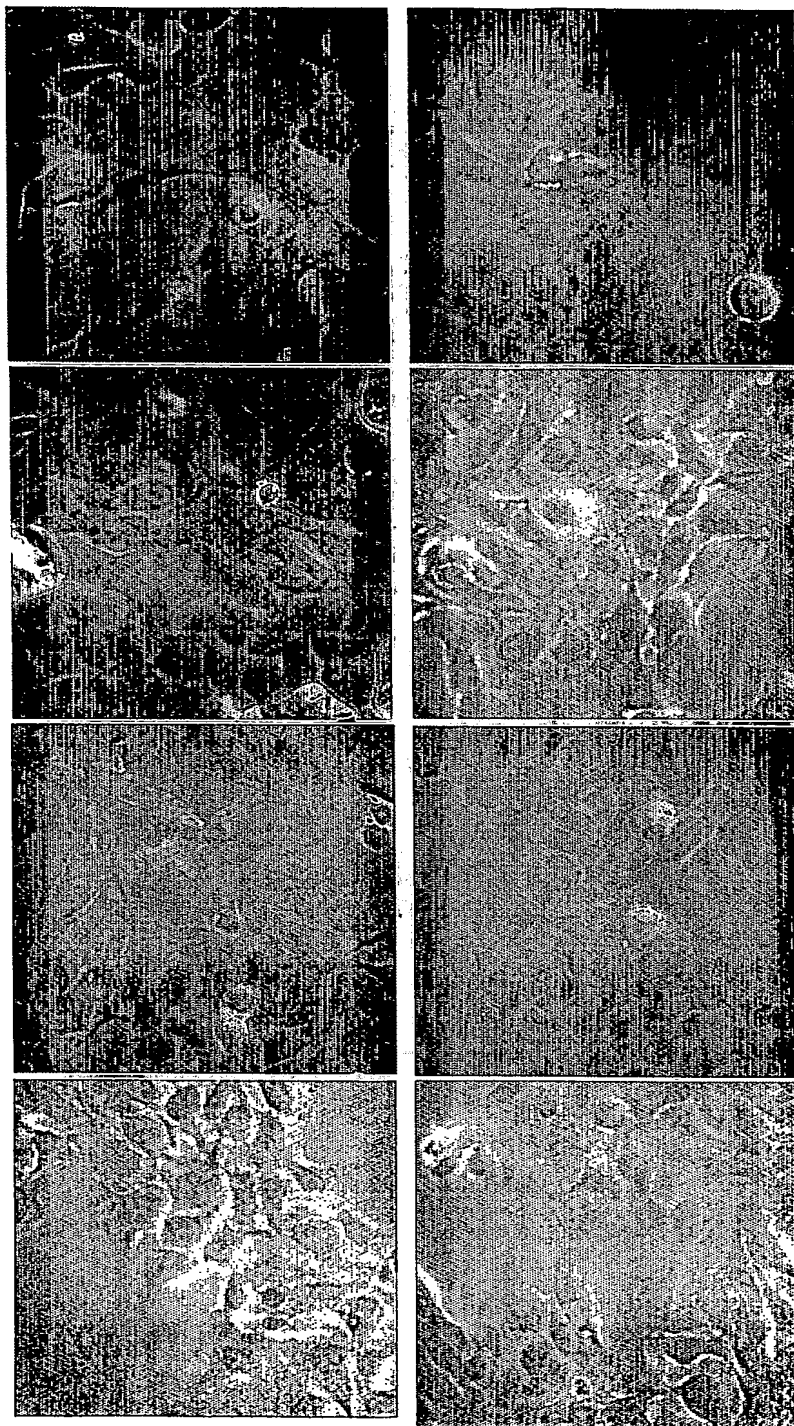


図 10

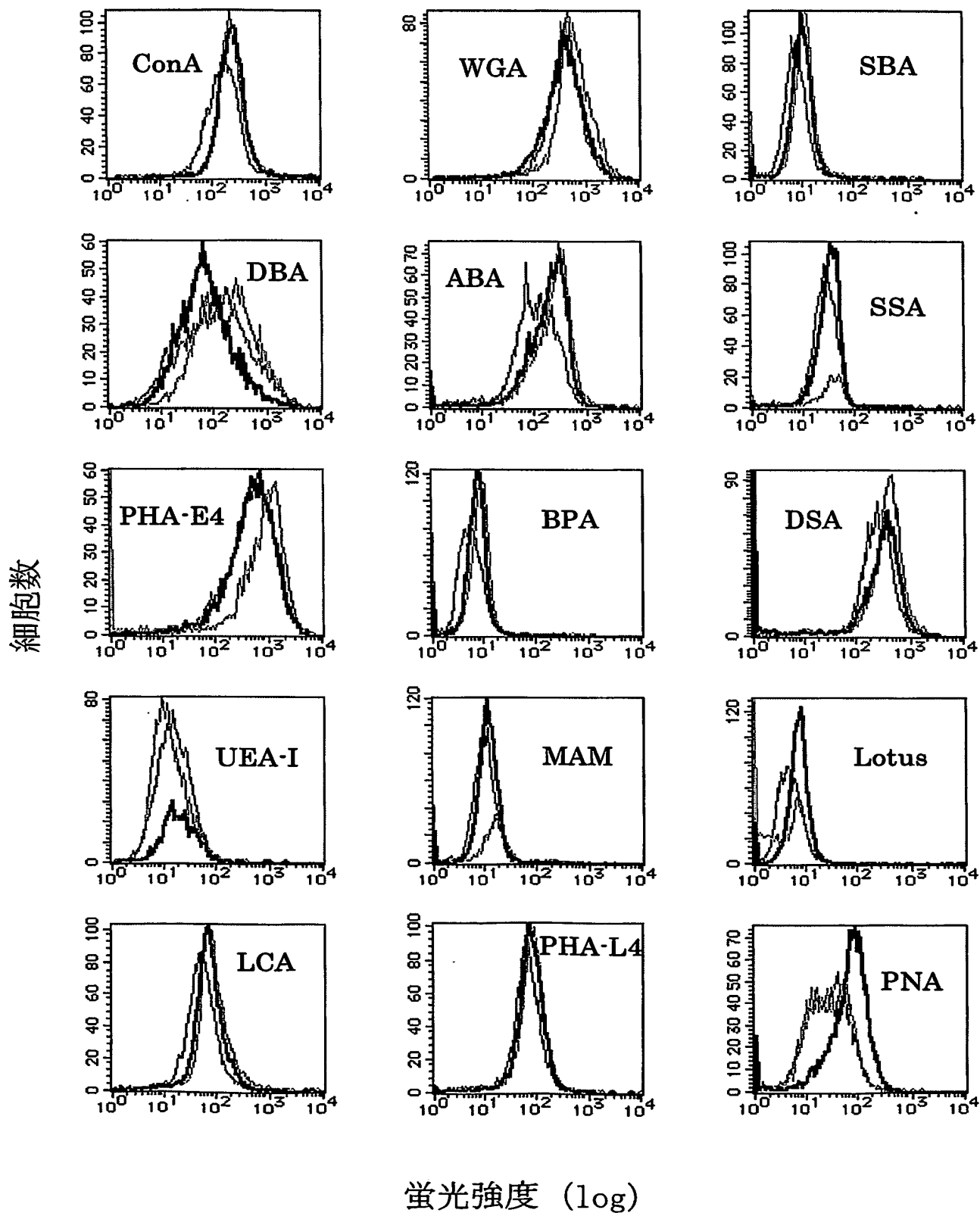


図 1 1

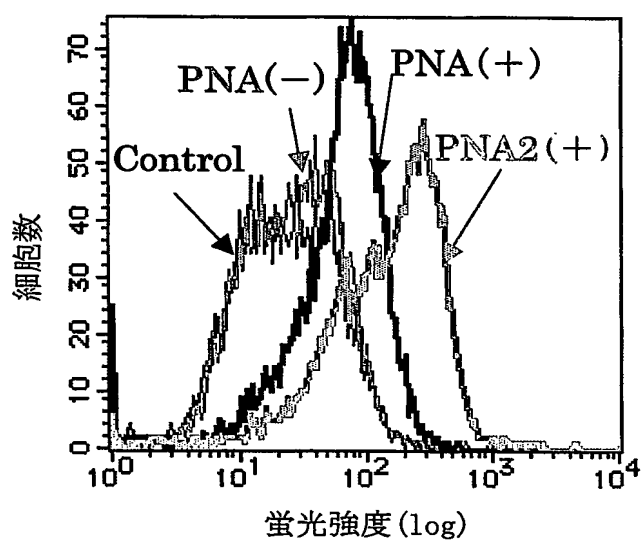


図 1 2

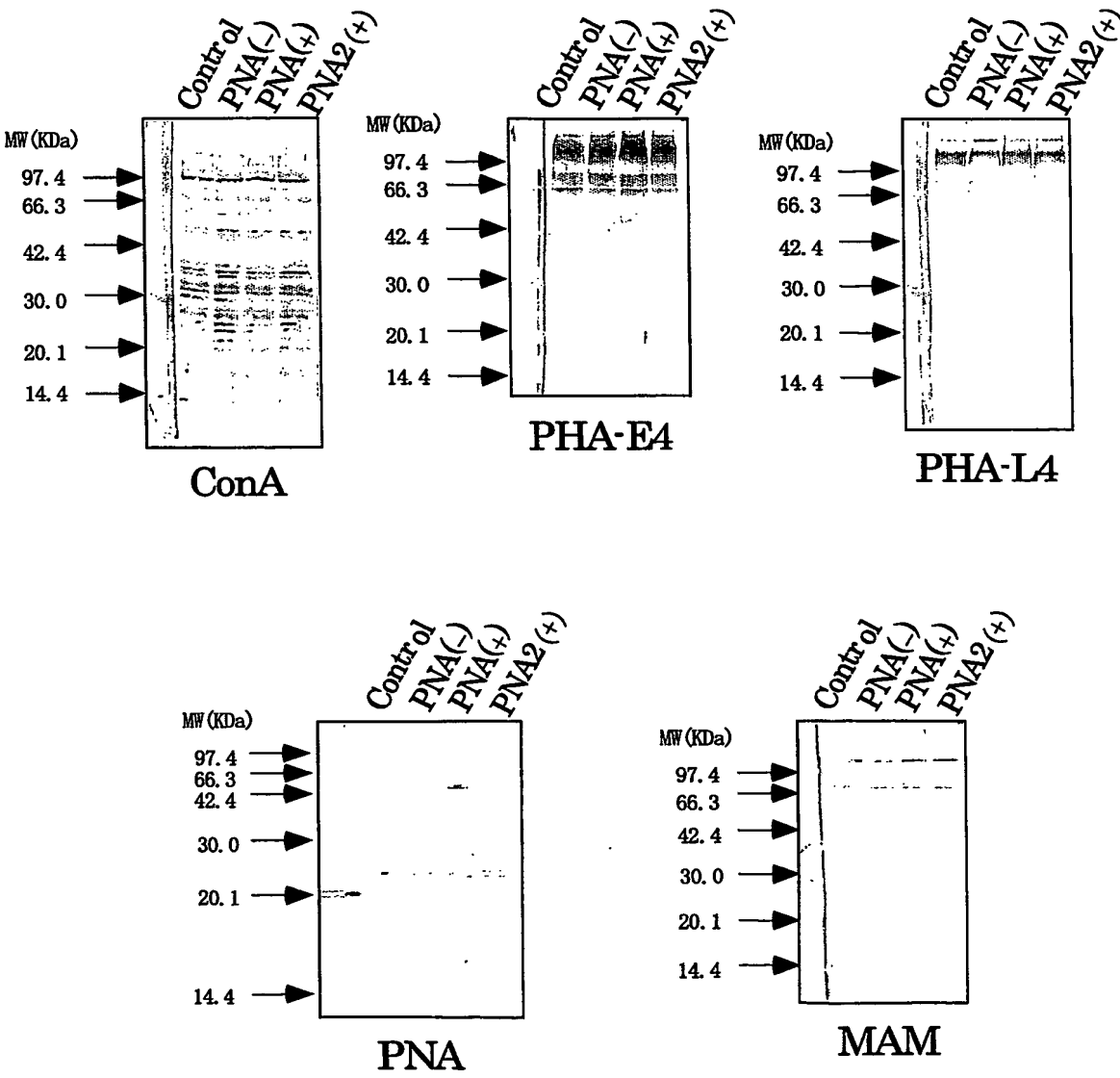


图 1 3

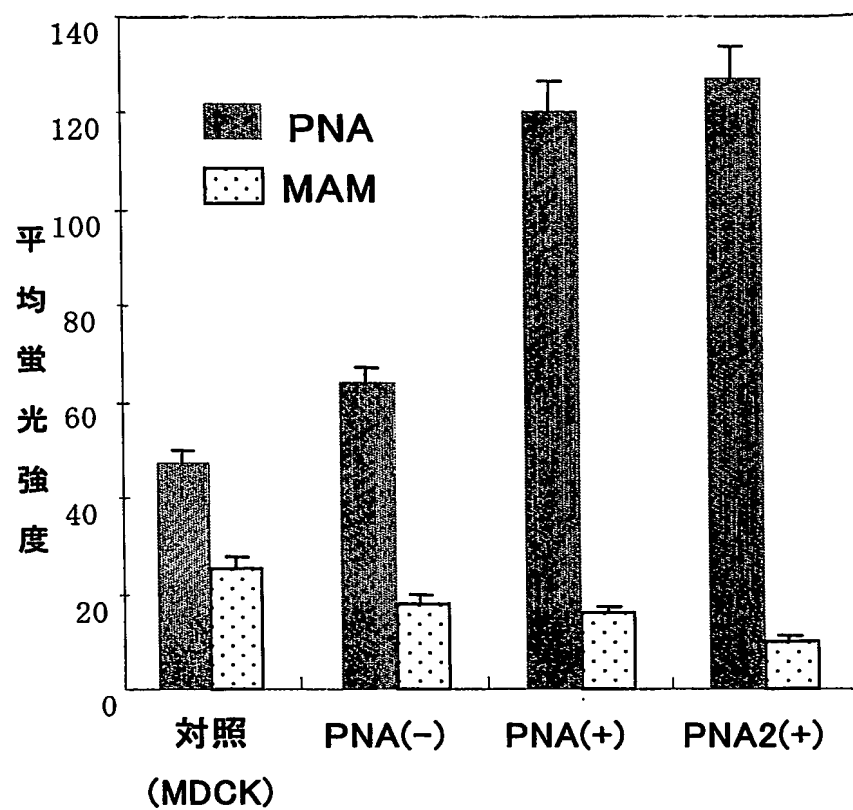


図14

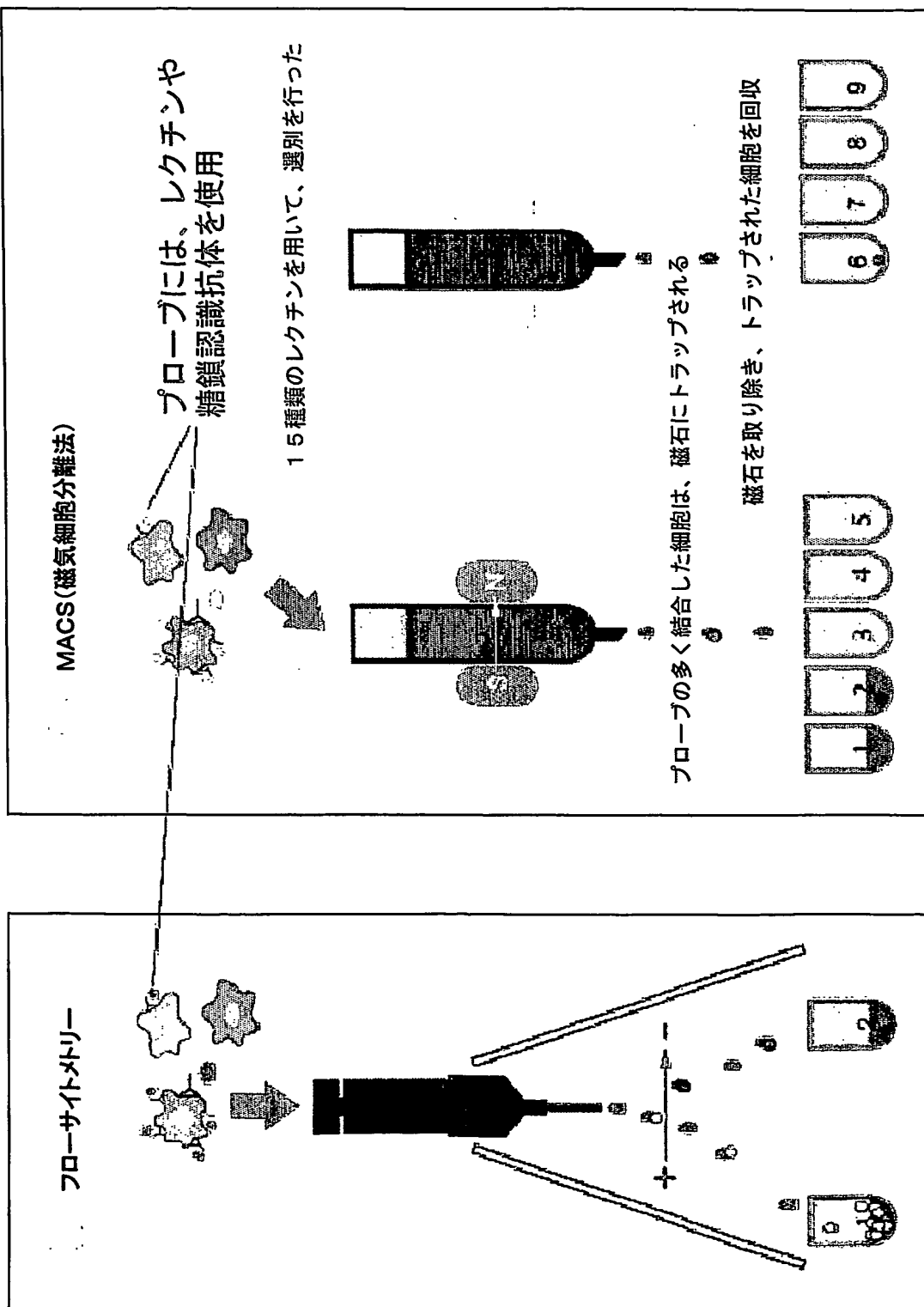


図 15

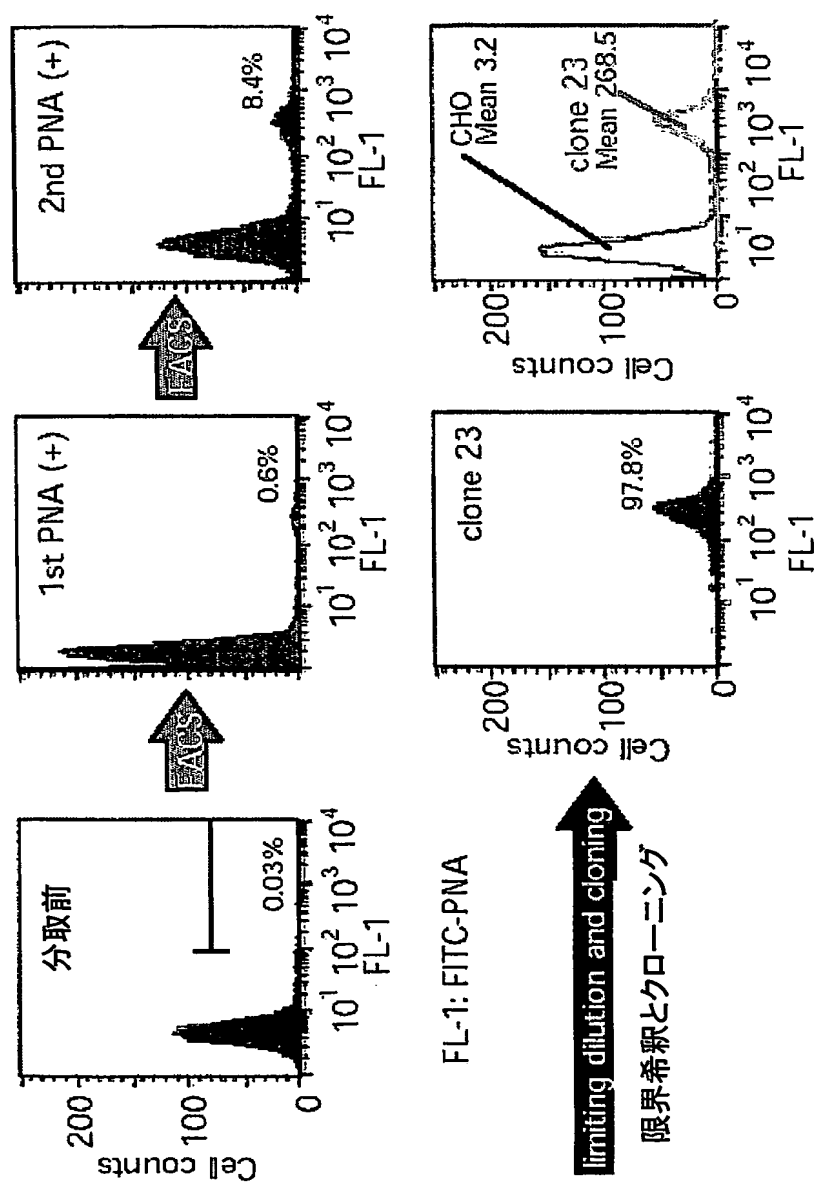
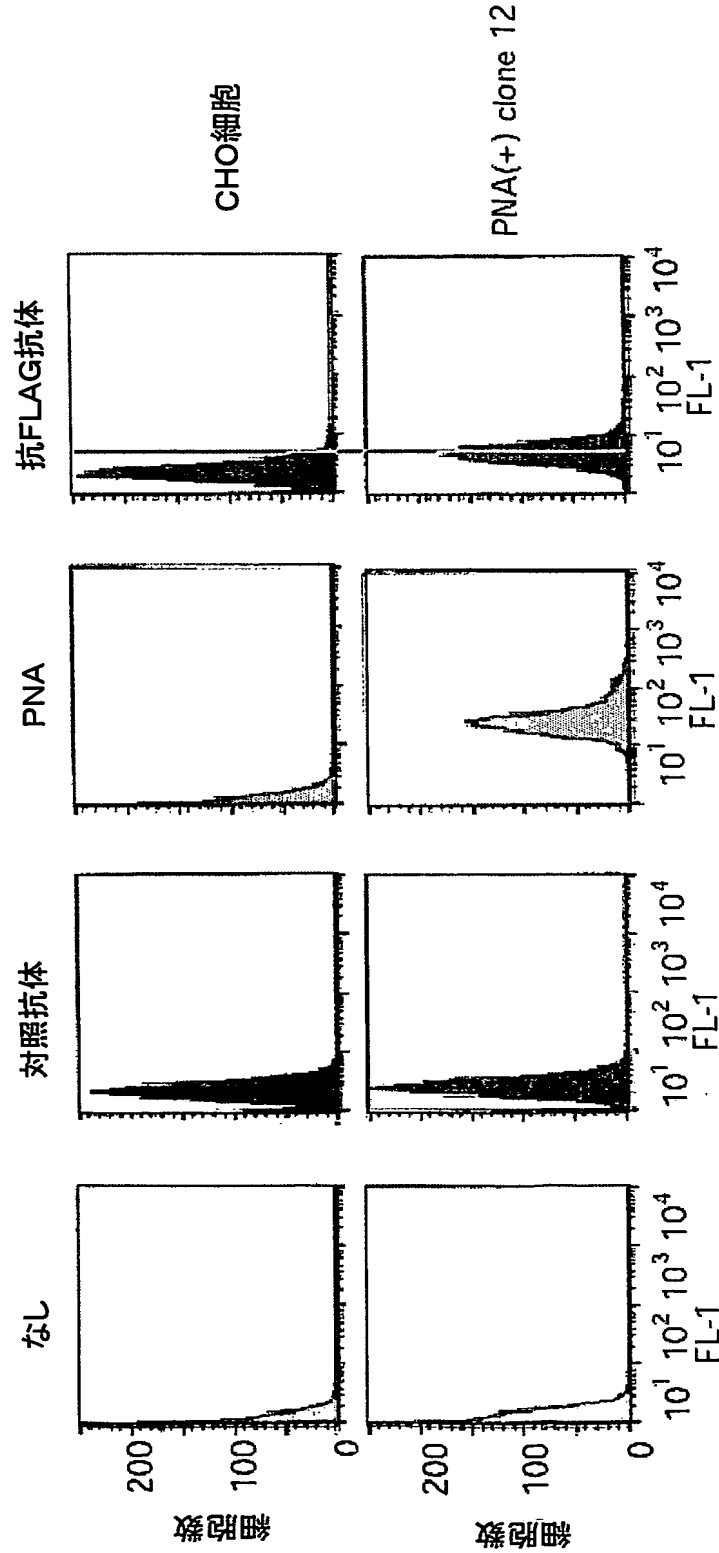


図 16



SEQUENCE LISTING

<110> YAMAMOTO, Kazuo

Sumitomo Corporation

<120> Sugar chain library generated by genetic modification
of cargo receptor

<130> PH-1716PCT

<140>

<141>

<150> JP 2002-238559

<151> 2002-08-19

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2768

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(1554)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (22)..(112)

<400> 1

ggtcgcgttc cagaatccaa g atg gcg gga tcc agg caa agg ggt ctc cgg 51

Met Ala Gly Ser Arg Gln Arg Gly Leu Arg

1 5 10

gcc aga gtt cgg ccg ctg ttc tgc gcc ttg ctg ctg tca ctc ggt cgc 99

Ala Arg Val Arg Pro Leu Phe Cys Ala Leu Leu Leu Ser Leu Gly Arg

15 20 25

ttc gtc cgg ggc gac ggc gtg gga gga gac ccc gcg gtc gcg ttg cca 147

Phe Val Arg Gly Asp Gly Val Gly Gly Asp Pro Ala Val Ala Leu Pro

30 35 40

cat cgc cgt ttc gag tac aaa tac agc ttc aag ggg ccg cac ctg gtg 195

His Arg Arg Phe Glu Tyr Lys Tyr Ser Phe Lys Gly Pro His Leu Val

45 50 55

cag agc gac ggg acc gtg ccc ttc tgg gcc cac gcg ggg aat gct att 243

Gln Ser Asp Gly Thr Val Pro Phe Trp Ala His Ala Gly Asn Ala Ile

60 65 70

cca agt tca gat caa att cga gta gca cca tct tta aaa agc caa aga 291

Pro Ser Ser Asp Gln Ile Arg Val Ala Pro Ser Leu Lys Ser Gln Arg

75 80 85 90

ggc tca gtg tgg aca aag aca aaa gcg gcc ttt gag aac tgg gaa gtt 339
Gly Ser Val Trp Thr Lys Thr Lys Ala Ala Phe Glu Asn Trp Glu Val
95 100 105

gag gtg aca ttt cga gtg act gga aga ggt cga att gga gct gat ggc 387
Glu Val Thr Phe Arg Val Thr Gly Arg Gly Arg Ile Gly Ala Asp Gly
110 115 120

cta gca att tgg tat gca gaa aat caa ggc ttg gag ggc cct gtg ttt 435
Leu Ala Ile Trp Tyr Ala Glu Asn Gln Gly Leu Glu Gly Pro Val Phe
125 130 135

gga tca gct gat ctg tgg aat ggt gtt gga ata ttt ttt gat act ttt 483
Gly Ser Ala Asp Leu Trp Asn Gly Val Gly Ile Phe Phe Asp Thr Phe
140 145 150

gac aat gat gga aag aaa aat aat cct gct ata gta att ata ggc aac 531
Asp Asn Asp Gly Lys Lys Asn Asn Pro Ala Ile Val Ile Ile Gly Asn
155 160 165 170

aat gga caa atc cat tat gac cat caa aat gac ggg gct agt caa gct 579
Asn Gly Gln Ile His Tyr Asp His Gln Asn Asp Gly Ala Ser Gln Ala
175 180 185

ttg gca agt tgc cag agg gac ttc cgc aac aaa ccc tat cct gtc cga 627
Leu Ala Ser Cys Gln Arg Asp Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Pro Val Arg
190 195 200

gca aag att acc tat tac cag aac aca ctg aca gta atg atc aat aat 675
Ala Lys Ile Thr Tyr Tyr Gln Asn Thr Leu Thr Val Met Ile Asn Asn
205 210 215

ggc ttt aca cca gat aaa aat gat tat gaa ttt tgt gcc aaa gtg gaa 723
Gly Phe Thr Pro Asp Lys Asn Asp Tyr Glu Phe Cys Ala Lys Val Glu
220 225 230

aat atg att atc cct gca caa ggg cat ttt gga ata tct gct gca act 771
Asn Met Ile Ile Pro Ala Gln Gly His Phe Gly Ile Ser Ala Ala Thr
235 240 245 250

gga ggt ctt gca gat gac cat gat gtc ctt tct ttt ctg act ttc cag 819
Gly Gly Leu Ala Asp Asp His Asp Val Leu Ser Phe Leu Thr Phe Gln
255 260 265

ttg act gaa cct gga aaa gag ccg ccc aca cca gat aaa gaa att tcg 867
Leu Thr Glu Pro Gly Lys Glu Pro Pro Thr Pro Asp Lys Glu Ile Ser
270 275 280

gaa aag gaa aaa gaa aag tat cag gag gaa ttt gag cac ttt caa caa 915
Glu Lys Glu Lys Glu Lys Tyr Gln Glu Glu Phe Glu His Phe Gln Gln
285 290 295

gaa ttg gat aaa aaa aaa gag gaa ttc cag aag ggc cac ccc gac ctc 963
Glu Leu Asp Lys Lys Lys Glu Glu Phe Gln Lys Gly His Pro Asp Leu
300 305 310

caa ggg cag cct gcg gag gaa ata ttt gag agt gta gga gat cga gag 1011

Gln Gly Gln Pro Ala Glu Glu Ile Phe Glu Ser Val Gly Asp Arg Glu
315 320 325 330

cta aga caa gtc ttt gaa gga cag aat cgt att cat ctt gaa atc aag 1059
Leu Arg Gln Val Phe Glu Gly Gln Asn Arg Ile His Leu Glu Ile Lys
335 340 345

cag ctg aac cgg cag tta gat atg att ctt gat gaa cag aga aga tat 1107
Gln Leu Asn Arg Gln Leu Asp Met Ile Leu Asp Glu Gln Arg Arg Tyr
350 355 360

gtc tct tcc tta aca gag gaa atc tct aaa aga gga gca gga atg cct 1155
Val Ser Ser Leu Thr Glu Glu Ile Ser Lys Arg Gly Ala Gly Met Pro
365 370 375

ggg cag cat ggg cag att act caa caa gaa ctg gat act gtt gtg aaa 1203
Gly Gln His Gly Gln Ile Thr Gln Gln Glu Leu Asp Thr Val Val Lys
380 385 390

act cag cat gag att ctg aga caa gta aat gaa atg aaa aat tcc atg 1251
Thr Gln His Glu Ile Leu Arg Gln Val Asn Glu Met Lys Asn Ser Met
395 400 405 410

agt gaa acc gtc aga ctg gtc agt gga atg cag cac cct ggc tct gct 1299
Ser Glu Thr Val Arg Leu Val Ser Gly Met Gln His Pro Gly Ser Ala
415 420 425

gga ggc gtc tat gag aca aca cag cac ttc att gac atc aaa gag cac 1347
Gly Gly Val Tyr Glu Thr Thr Gln His Phe Ile Asp Ile Lys Glu His

430

435

440

ctg cac ata gta aag agg gac ata gat aac tta gtg cag cga aat atg 1395
Leu His Ile Val Lys Arg Asp Ile Asp Asn Leu Val Gln Arg Asn Met
445 450 455

cca tca aat gaa aag ccg aaa tgc cca gaa cta cca cca ttt cca tca 1443
Pro Ser Asn Glu Lys Pro Lys Cys Pro Glu Leu Pro Pro Phe Pro Ser
460 465 470

tgt ttg tct acg gtc cac ttc att ata ttt gtt gtg gtg caa act gta 1491
Cys Leu Ser Thr Val His Phe Ile Ile Phe Val Val Val Gln Thr Val
475 480 485 490

tta ttc att ggt tat atc atg tat agg tct cag caa gaa gca gct gcc 1539
Leu Phe Ile Gly Tyr Ile Met Tyr Arg Ser Gln Gln Glu Ala Ala Ala
495 500 505

aaa aaa ttc ttt tga ctaccatttt cctgtgtact tcattctattt gtgtacaaaa 1594
Lys Lys Phe Phe
510

tgagtcgttt tgagggaatt taagtattta aattgcttca tagtctaaat tattaatttt 1654

cttaataaaa taactgttta aacattgatt tgcagttaag aataaacctt aaagcaaaga 1714

caaccacatt ttaatttggt cacagtatgt aaatctgtct aaatttcagt gaatttctgg 1774

tcagtatgat gcagcctctg agcagaatat tgaccagtaa gagggtaaataa aaagtggggg 1834

caaccctgga tatgaatggt accccctaag tctccaatat tgcaggtttc cctgtataac 1894
gtaaacacac ttgccctcat gcctcccaga atatgaggtc taattaagaa gtccatcagg 1954
tttattttgt aaccaaagtc ttttttagag gtcagacttc ctaatcaaag gcctgggcct 2014
gcagtccctt tcatcttaat gcaacttcct ttgaaatcaa agaataatatt gtctgagagc 2074
tttaaggatc tggtaataga cttcaaaatg ttaagtgaat ttttttttct ctctatttat 2134
caatgatata tttcactttt aaaggaaatt ttagaggaaa attaataagct gctttttgca 2194
ctaaaaaacc ttgtgggtgg aaatattcct ctgagaatgg cttttatagg tattttgcct 2254
ggtaatgtat tcattcatga ttgcccatat tcttgaatgt ttcttcattc caatgggggc 2314
aggccaatat tatgaaaata atttttatat ttatatattgt aactaagaat ttattttctc 2374
ctttactaca cgatgtaaat tcacgtcaaa ttcatgac tgaggattta aattcacaaa 2434
acctgccact acattctggt ttacattagt tacttcatgc tggctggggg tagtgaccat 2494
ttgcatactc ttttaaata aggaggctgt agtagaggca gttttaagat tcttgaaggc 2554
aaaatttgaa aaacagtga tactttcta tgttttcctt tagtgccaga actaagacat 2614
tgtgaagcac ttgttagtaa acttaacctt gaaatgtcag actggaagga gtttttatgt 2674

ctttgtgcat acttctgggt attacagaaa cagtctgtaa ataacatttt aagatgcaaa 2734

tttaattctg ttcacagctg atttatactg attt 2768

<210> 2

<211> 510

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Gly Ser Arg Gln Arg Gly Leu Arg Ala Arg Val Arg Pro Leu
1 5 10 15

Phe Cys Ala Leu Leu Leu Ser Leu Gly Arg Phe Val Arg Gly Asp Gly
20 25 30

Val Gly Gly Asp Pro Ala Val Ala Leu Pro His Arg Arg Phe Glu Tyr
35 40 45

Lys Tyr Ser Phe Lys Gly Pro His Leu Val Gln Ser Asp Gly Thr Val
50 55 60

Pro Phe Trp Ala His Ala Gly Asn Ala Ile Pro Ser Ser Asp Gln Ile
65 70 75 80

Arg Val Ala Pro Ser Leu Lys Ser Gln Arg Gly Ser Val Trp Thr Lys
85 90 95

Thr Lys Ala Ala Phe Glu Asn Trp Glu Val Glu Val Thr Phe Arg Val
8/23

100	105	110
Thr Gly Arg Gly Arg Ile Gly Ala Asp Gly Leu Ala Ile Trp Tyr Ala		
115	120	125
Glu Asn Gln Gly Leu Glu Gly Pro Val Phe Gly Ser Ala Asp Leu Trp		
130	135	140
Asn Gly Val Gly Ile Phe Phe Asp Thr Phe Asp Asn Asp Gly Lys Lys		
145	150	155 160
Asn Asn Pro Ala Ile Val Ile Ile Gly Asn Asn Gly Gln Ile His Tyr		
165	170	175
Asp His Gln Asn Asp Gly Ala Ser Gln Ala Leu Ala Ser Cys Gln Arg		
180	185	190
Asp Phe Arg Asn Lys Pro Tyr Pro Val Arg Ala Lys Ile Thr Tyr Tyr		
195	200	205
Gln Asn Thr Leu Thr Val Met Ile Asn Asn Gly Phe Thr Pro Asp Lys		
210	215	220
Asn Asp Tyr Glu Phe Cys Ala Lys Val Glu Asn Met Ile Ile Pro Ala		
225	230	235 240
Gln Gly His Phe Gly Ile Ser Ala Ala Thr Gly Gly Leu Ala Asp Asp		
245	250	255

His Asp Val Leu Ser Phe Leu Thr Phe Gln Leu Thr Glu Pro Gly Lys
260 265 270

Glu Pro Pro Thr Pro Asp Lys Glu Ile Ser Glu Lys Glu Lys Glu Lys
275 280 285

Tyr Gln Glu Glu Phe Glu His Phe Gln Gln Glu Leu Asp Lys Lys Lys
290 295 300

Glu Glu Phe Gln Lys Gly His Pro Asp Leu Gln Gly Gln Pro Ala Glu
305 310 315 320

Glu Ile Phe Glu Ser Val Gly Asp Arg Glu Leu Arg Gln Val Phe Glu
325 330 335

Gly Gln Asn Arg Ile His Leu Glu Ile Lys Gln Leu Asn Arg Gln Leu
340 345 350

Asp Met Ile Leu Asp Glu Gln Arg Arg Tyr Val Ser Ser Leu Thr Glu
355 360 365

Glu Ile Ser Lys Arg Gly Ala Gly Met Pro Gly Gln His Gly Gln Ile
370 375 380

Thr Gln Gln Glu Leu Asp Thr Val Val Lys Thr Gln His Glu Ile Leu
385 390 395 400

Arg Gln Val Asn Glu Met Lys Asn Ser Met Ser Glu Thr Val Arg Leu
405 410 415

Val Ser Gly Met Gln His Pro Gly Ser Ala Gly Gly Val Tyr Glu Thr
420 425 430

Thr Gln His Phe Ile Asp Ile Lys Glu His Leu His Ile Val Lys Arg
435 440 445

Asp Ile Asp Asn Leu Val Gln Arg Asn Met Pro Ser Asn Glu Lys Pro
450 455 460

Lys Cys Pro Glu Leu Pro Pro Phe Pro Ser Cys Leu Ser Thr Val His
465 470 475 480

Phe Ile Ile Phe Val Val Val Gln Thr Val Leu Phe Ile Gly Tyr Ile
485 490 495

Met Tyr Arg Ser Gln Gln Glu Ala Ala Ala Lys Lys Phe Phe
500 505 510

<210> 3

<211> 1407

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1071)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(134)

<400> 3

atg gcg gcg gaa ggc tgg att tgg cgt tgg ggc tgg ggc cgg cgg tgc 48

Met Ala Ala Glu Gly Trp Ile Trp Arg Trp Gly Trp Gly Arg Arg Cys

1 5 10 15

ctg gga agg cct ggg ctt ctc ggc ccc ggc cct ggc ccc act aca cct 96

Leu Gly Arg Pro Gly Leu Leu Gly Pro Gly Pro Gly Pro Thr Thr Pro

20 25 30

ctc ttt ctt ctt ttg ttg ttg ggg tct gtg act gcg gat ata act gac 144

Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Val Thr Ala Asp Ile Thr Asp

35 40 45

ggc aac agt gaa cat ctc aag cgg gag cat tcg ctc att aag ccc tac 192

Gly Asn Ser Glu His Leu Lys Arg Glu His Ser Leu Ile Lys Pro Tyr

50 55 60

caa ggg gtc ggt tcc agc tct atg ccc ctc tgg gac ttc cag ggc agc 240

Gln Gly Val Gly Ser Ser Ser Met Pro Leu Trp Asp Phe Gln Gly Ser

65 70 75 80

act atg ctc acg agc cag tac gta cgt ctg acc cct gac gag cgc agc 288

Thr Met Leu Thr Ser Gln Tyr Val Arg Leu Thr Pro Asp Glu Arg Ser

85 90 95

aaa gag ggc tct atc tgg aac cac cag ccg tgc ttc ctc aaa gac tgg 336

Lys Glu Gly Ser Ile Trp Asn His Gln Pro Cys Phe Leu Lys Asp Trp
100 105 110

gaa atg cac gtc cac ttc aaa gtc cac ggc aca ggg aag aag aac ctc 384
Glu Met His Val His Phe Lys Val His Gly Thr Gly Lys Lys Asn Leu
115 120 125

cat gga gac ggc atc gcc ttg tgg tac acc cgg gac cgc ctc gtg cca 432
His Gly Asp Gly Ile Ala Leu Trp Tyr Thr Arg Asp Arg Leu Val Pro
130 135 140

ggg cct gtg ttt gga agc aaa gat aac ttc cac ggc tta gcc atc ttc 480
Gly Pro Val Phe Gly Ser Lys Asp Asn Phe His Gly Leu Ala Ile Phe
145 150 155 160

ctg gac acc tac ccc aat gat gag acc act gag cgc gtg ttc ccg tac 528
Leu Asp Thr Tyr Pro Asn Asp Glu Thr Thr Glu Arg Val Phe Pro Tyr
165 170 175

atc tcg gtg atg gtg aac aat ggc tcc ctg tcc tac gac cac agc aag 576
Ile Ser Val Met Val Asn Asn Gly Ser Leu Ser Tyr Asp His Ser Lys
180 185 190

gat ggg cgc tgg acc gag ctg gcg ggc tgc acg gct gac ttc cgc aac 624
Asp Gly Arg Trp Thr Glu Leu Ala Gly Cys Thr Ala Asp Phe Arg Asn
195 200 205

cgc gat cac gac acc ttc ctg gct gtg cgc tac tcc cgg ggc cgt ctg 672
Arg Asp His Asp Thr Phe Leu Ala Val Arg Tyr Ser Arg Gly Arg Leu

210

215

220

acg gtg atg acc gac ctg gag gac aag aac gag tgg aag aac tgc att 720

Thr Val Met Thr Asp Leu Glu Asp Lys Asn Glu Trp Lys Asn Cys Ile

225

230

235

240

gac atc acg gga gtg cgc ctg ccc acc ggc tac tac ttc ggg gcc tcc 768

Asp Ile Thr Gly Val Arg Leu Pro Thr Gly Tyr Tyr Phe Gly Ala Ser

245

250

255

gcc ggc acc ggc gac ctg tct gac aat cat gac atc atc tcc atg aag 816

Ala Gly Thr Gly Asp Leu Ser Asp Asn His Asp Ile Ile Ser Met Lys

260

265

270

ctg ttc cag ctg atg gtg gag cac acg ccc gac gag gag agc atc gac 864

Leu Phe Gln Leu Met Val Glu His Thr Pro Asp Glu Glu Ser Ile Asp

275

280

285

tgg acc aag atc gag ccc agc gtc aac ttc ctc aag tcg ccc aaa gac 912

Trp Thr Lys Ile Glu Pro Ser Val Asn Phe Leu Lys Ser Pro Lys Asp

290

295

300

aac gtg gac gac ccc acg ggg aac ttc cgc agc ggg ccc ctg acg ggg 960

Asn Val Asp Asp Pro Thr Gly Asn Phe Arg Ser Gly Pro Leu Thr Gly

305

310

315

320

tgg cgg gtg ttc ctg ctg ctg ctg tgc gct ctc ctg ggc atc gtt gtc 1008

Trp Arg Val Phe Leu Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu Gly Ile Val Val

325

330

335

tgc gcc gtg gtg ggg gcc gtg gtg ttc cag aag cgg cag gag cgg aac 1056
Cys Ala Val Val Gly Ala Val Val Phe Gln Lys Arg Gln Glu Arg Asn

340

345

350

aag cgc ttc tac tga gtggcgctc cggcggggcc tgtccctggg cccaggagcc 1111

Lys Arg Phe Tyr

355

aatgtgaact ttttttttta cgggattat aaaagaacaa caagatgacc ttatttctta 1171

actgtttcaa ataaatgatt aaagtatttt catacatttt gcttcttgcc cagcagggac 1231

aggtggcaga gccgaggctt agggctctggc accccccaca gctggagacg gaggctctcc 1291

tggggctggt gtctcaggag caggggtctg tgtctacaga tgggctgtgg cccctgcagg 1351

cagctgttga acactggagg gtcccccgga ccacactggg gtgggctcct gaggac 1407

<210> 4

<211> 356

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ala Glu Gly Trp Ile Trp Arg Trp Gly Trp Gly Arg Arg Cys

1

5

10

15

Leu Gly Arg Pro Gly Leu Leu Gly Pro Gly Pro Gly Pro Thr Thr Pro

15/23

20

25

30

Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Val Thr Ala Asp Ile Thr Asp

35

40

45

Gly Asn Ser Glu His Leu Lys Arg Glu His Ser Leu Ile Lys Pro Tyr

50

55

60

Gln Gly Val Gly Ser Ser Ser Met Pro Leu Trp Asp Phe Gln Gly Ser

65

70

75

80

Thr Met Leu Thr Ser Gln Tyr Val Arg Leu Thr Pro Asp Glu Arg Ser

85

90

95

Lys Glu Gly Ser Ile Trp Asn His Gln Pro Cys Phe Leu Lys Asp Trp

100

105

110

Glu Met His Val His Phe Lys Val His Gly Thr Gly Lys Lys Asn Leu

115

120

125

His Gly Asp Gly Ile Ala Leu Trp Tyr Thr Arg Asp Arg Leu Val Pro

130

135

140

Gly Pro Val Phe Gly Ser Lys Asp Asn Phe His Gly Leu Ala Ile Phe

145

150

155

160

Leu Asp Thr Tyr Pro Asn Asp Glu Thr Thr Glu Arg Val Phe Pro Tyr

165

170

175

Ile Ser Val Met Val Asn Asn Gly Ser Leu Ser Tyr Asp His Ser Lys
180 185 190

Asp Gly Arg Trp Thr Glu Leu Ala Gly Cys Thr Ala Asp Phe Arg Asn
195 200 205

Arg Asp His Asp Thr Phe Leu Ala Val Arg Tyr Ser Arg Gly Arg Leu
210 215 220

Thr Val Met Thr Asp Leu Glu Asp Lys Asn Glu Trp Lys Asn Cys Ile
225 230 235 240

Asp Ile Thr Gly Val Arg Leu Pro Thr Gly Tyr Tyr Phe Gly Ala Ser
245 250 255

Ala Gly Thr Gly Asp Leu Ser Asp Asn His Asp Ile Ile Ser Met Lys
260 265 270

Leu Phe Gln Leu Met Val Glu His Thr Pro Asp Glu Glu Ser Ile Asp
275 280 285

Trp Thr Lys Ile Glu Pro Ser Val Asn Phe Leu Lys Ser Pro Lys Asp
290 295 300

Asn Val Asp Asp Pro Thr Gly Asn Phe Arg Ser Gly Pro Leu Thr Gly
305 310 315 320

Trp Arg Val Phe Leu Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu Gly Ile Val Val
325 330 335

Cys Ala Val Val Gly Ala Val Val Phe Gln Lys Arg Gln Glu Arg Asn

340

345

350

Lys Arg Phe Tyr

355

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 5

gcatgtcgac ataactgacg gcaacagtg

29

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 6

gagctctaga aagatggcta agccgtggaa

30

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<220>

<223> N=A, T, C or G

<400> 7

cgtgctctag acnnknnknn kaatnnknnk nnknnkgagc gcgtgttccc gta

53

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 8

atcgtcttaa gcactcagta gaagcgcttg

30

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 9

gactacaaag acgatgacga caag

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 10

ctagaagtcc ttaagagtcg ggcc

24

<210> 11

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 11

cgactcttaa ggactt

16

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 12

gtacgtcgac ggcgtgggag gag

23

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 13

cgtatctaga aatattccaa caccattcca

30

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<220>

<223> N=A, T, C or G

<400> 14

cgtatctaga tnnknnknnk aatnnknnkn nknkaataa tcctgctata gtaattat 58

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 15

cgtacttaag tggtagtcaa aagaattttt tg

32

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
oligonucleotide

<400> 16

gaccctgatt ctaatggtgg ttctttt

27

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic
peptide

<400> 17

Asp Pro Asp Ser Asn Gly Gly Ser Phe

1

5

特許協力条約に基づく国際出願願書

PH-1716-PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2003年02月18日（18. 02. 2003）火曜日 15時32分27秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4. 17(v)及び51の2. 1(a)(v)）	本国際出願に関し、 山本 一夫は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2002年02月18日（18. 02. 2002）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	平成13年度 修士論文要旨（東京大学大学院新領域創成科学研究科・先端生命科学専攻）P22-23, P26-27
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/01718

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07H1/00, C07H3/00,
C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12P21/02, C07K14/47, C07H1/00, C07H3/00,
C12N5/10, C12Q1/02, G01N33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE(STN), JICST FILE(JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yoko HIRAI et al., "VIP36 Bunshi no Kaihen ni yoru Saibonai Sorting Katei no Henka", Nihon Yakugakkai Dai 121 nenkai Yoshishu, 05 March, 2001 (05.03.01), page 7	1-13
X	Takayo UENO et al., "ERGIC-53 no Kaihen ni okeru Saibonai Transport ni tsuite", Nihon Yakugakkai Dai 121 nenkai Yoshishu, 05 March, 2001 (05.03.01), page 9	1-13
Y	YAMAMOTO, K. et al., Cyborg lectins: novel leguminous lectins with unique specificities. J.Biochem., January, 2000, Vol.127, No.1, pages 137 to 142	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
04 June, 2003 (04.06.03)

Date of mailing of the international search report
17 June, 2003 (17.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01718

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YAMAMOTO, K. et al., A chimeric lectin formed from Bauhinia purpurea lectin and Lens culinaris lectin recognizes a unique carbohydrate structure. J.Biochem., January, 2000, Vol.127, No.1, pages 129 to 135	1-13
Y	YAMAMOTO, K. et al., Analysis of asparagine-linked oligosaccharides by sequential lectin-affinity chromatography., Methods Mol.Biol., 1998, Vol.76, pages 35 to 51	1-13
Y	HAURI, H.P. et al., ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway., J.Cell Sci., February, 2000, Vol.113, Pt.4, pages 587 to 596	1-13
Y	VELLOSO, L.M. et al., Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of p58/ERGIC-53, a protein involved in glycoprotein export from the endoplasmic reticulum., J.Biol.Chem., 03 May, 2002 (03.05.02), Vol.277, No.18, pages 15979 to 15984	1-13
Y	APPENZELLER, C. et al., The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. Nat.Cell Biol., 1999, Vol.1, No.6, pages 330 to 334	1-13
Y	HAURI, H. et al., Lectins and traffic in the secretory pathway., FEBS Lett., 30 June, 2000 (30.06.00), Vol.476, Nos. 1 to 2, pages 32 to 37	1-13
P,X	Kazuo YAMAMOTO, "Shokubutsu Mame-ka Lectin no Tousa Ninshiki Kiko to cargo receptor Kaihen ni yoru Oyo", Dai 25 kai The Molecular Biology Society of Japan nenkai Program Koen Yoshishu, 25 November, 2002 (25.11.02), page 410	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 14/47, C07H 1/00, C07H 3/00, C12N 5/10, C12Q 1/02, G01N 33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 14/47, C07H 1/00, C07H 3/00, C12N 5/10, C12Q 1/02, G01N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICSTファイル (JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	平井 洋子 他, VIP36分子の改変による細胞内ソーティング過程の 変化 日本薬学会第121年会要旨集 2001. Mar. 5, p. 7	1-13
X	上野 貴代 他, ERGIC-53の改変における細胞内トランスポートにつ いて 日本薬学会第121年会要旨集 2001. Mar. 5, p. 9	1-13
Y	YAMAMOTO, K. et al. Cyborg lectins: novel leguminous lectins with unique specificities. J. Biochem. 2000. Jan., Vol. 127, No. 1, p. 137-142	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 06. 03

国際調査報告の発送日

17.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4 B

9281

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YAMAMOTO, K. et al. A chimeric lectin formed from Bauhinia purpurea lectin and Lens culinaris lectin recognizes a unique carbohydrate structure. J. Biochem. 2000. Jan. , Vol. 127, No. 1, p. 129-135	1-13
Y	YAMAMOTO, K. et al. Analysis of asparagine-linked oligosaccharides by sequential lectin-affinity chromatography. Methods Mol. Biol. 1998, Vol. 76, p. 35-51	1-13
Y	HAURI, H. P. et al. ERGIC-53 and traffic in the secretory pathway. J. Cell Sci. 2000. Feb. , Vol. 113, Pt. 4, p. 587-596	1-13
Y	VELLOSO, L. M. et al. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of p58/ERGIC-53, a protein involved in glycoprotein export from the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 2002. May. 3, Vol. 277, No. 18, p. 15979-15984	1-13
Y	APPENZELLER, C. et al. The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. Nat. Cell Biol. 1999, Vol. 1, No. 6, p. 330-334	1-13
Y	HAURI, H. et al. Lectins and traffic in the secretory pathway. FEBS Lett. 2000. Jun. 30, Vol. 476, No. 1-2, p. 32-37	1-13
P, X	山本 一夫, 植物マメ科レクチンの糖鎖認識機構とcargo receptor 改変による応用 第25回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集 2002. Nov. 25, p. 410	1-13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.